

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

TONKA ROŠA

**UTJECAJ OKOLIŠNIH I GENETIČKIH FAKTORA  
NA KRVNI TLAK STANOVNIŠTVA OTOKA VISA**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2009.

Diplomski je rad izrađen u Institutu za antropologiju u Zagrebu u sklopu znanstvenog projekta «Kompleksna obilježja i zdravlje stanovništva od djetinjstva do duboke starosti» (196-1962766-2747) koji se provodi uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

Voditeljica rada: prof. dr.sc. Nina Smolej Naranj

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Nini Smolej Naran i koja mi je svojim znanjem i iskustvom uz puno strpljenja iznimno pomogla prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem akademiku Pavlu Rudanu koji mi je omogućio sudjelovanje na znanstvenom projektu u Institutu za antropologiju.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju, razumijevanju i moralnoj podršci.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matemati ki fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **UTJECAJ OKOLIŠNIH I GENETI KIH IMBENIKA NA KRVNI TLAK STANOVNIŠTVA OTOKA VISA**

Tonka Roša

#### Sažetak

U ovom istraživanju nastojalo se utvrditi utje e li *ACE I/D* polimorfizam, kao primjer geneti kog imbenika unutar jednog od gena odgovornog za regulaciju krvnog tlaka, na krvni tlak ovjeka, s naglaskom na nastanak hipertenzije. Preostali nepromjenjivi imbenici izu avani u ovom radu su spol i dob, a uz njih izu avani su promjenjivi, u širem smislu okolišni, imbenici: debljina, razina masno a u krvi i navika pušenja. Pri tome je korišten uzorak izolirane populacije otoka Visa koji se sastoji od 140 osoba u dobi od 40 do 81 godine. Ustanovljena je pozitivna korelacija sistoli kog tlaka s dobi, indeksom tjelesne mase (BMI) i koncentracijom triglicerida, te pozitivna korelacija dijastoli kog tlaka s BMI i koncentracijom triglicerida, a negativna s brojem godina pušenja i indeksom pušenja. Kod muškaraca je zna ajan utjecaj na povišenje krvnog tlaka imala koncentracija triglicerida, a kod žena je to bio BMI. Budu i da *ACE I/D* polimorfizam nije u kodiraju oj regiji, pretpostavlja se da pokazuje efekt nekog drugog, funkcionalnog polimorfizma, koji je u neravnoteži vezanosti gena s izu avanim. Rezultati su pokazali da se utjecaj polimorfizma *ACE* gena može objasniti recesivnim modelom, tj. „rizi ni“ alel utje e na pojavu hipertenzije jedino u homozigotnoj formi. Pove an utjecaj *ACE I/D* polimorfizma na nastanak hipertenzije utvr en je nakon uklju enja rizi nih imbenika kao što su spol, dob, BMI, koncentracija kolesterola, HDL kolesterola i triglicerida te indeks pušenja. Me upopulacijskom usporedbom izme u op e populacije Republike Hrvatske i populacije otoka Visa potvr ena je pogodnost ove izolirane populacije za istraživanja geneti ke podloge hipertenzije kao kompleksnog poreme aja.

(47 stranica, 5 slika, 18 tablica, 99 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Klju ne rije i: krvni tlak ovjeka, hipertenzija, *ACE I/D* polimorfizam, populacijski izolat, otok Vis

Voditelj: prof. dr. sc. Nina Smolej Naran i

Ocjenjiva i: prof. dr. sc. Mirjana Kalafati , prof. dr. sc. Nina Smolej Naran i , prof. dr. sc. Zdravko Dolenec, doc. dr. sc. Vesna Benkovi

Rad prihva en: 08.04.2009.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation These

### **THE EFFECT OF ENVIROMENTAL AND GENETIC FACTORS ON BLOOD PRESSURE IN THE POPULATION OF THE ISLAND VIS**

Tonka Roša  
Institute for Anthropological Research, Zagreb

This study aimed to determine whether *ACE I/D* polymorphism, as a genetic factor located within one of the genes responsible for controlling blood pressure, affects human blood pressure, with an emphasis on hypertension. The remaining factors studied in this work were gender and age as well as, in a broader sense, environmental factors: obesity, fat components in the blood and smoking habit. The sample was drawn from the population isolate of the island of Vis and consisted of 140 persons 40 to 81 years old. A positive correlation was established between systolic pressure and age, BMI and triglyceride concentration, and between the diastolic blood pressure and BMI and triglyceride concentration, as well as a negative correlation between diastolic blood pressure and the number of smoking years and smoking index. A significant influence on the increase of blood pressure in men had the concentration of triglycerides, while in women it was the BMI. Since *ACE I/D* polymorphism is not located in the coding region of the gene, it was supposed that it showed the effect of another polymorphism that is functional and in the linkage disequilibrium with it. The effect of *ACE I/D* polymorphism has been shown to obey the recessive model, i.e. the „risk“ allele influenced the development of hypertension only in its homozygous form. The influence of *ACE I/D* polymorphism on the development of hypertension was found also after taking into account the other risk factors such as gender, age, BMI and the concentrations of cholesterol, HDL and triglycerides as well as smoking index. Comparison between the general population of Croatia and the population of island Vis confirmed the suitability of this isolated population for genetic research of hypertension as a complex disorder.

(47 pages, 5 figures, 18 tables, 99 references, original in Croatian)

These is deposited in Central Biological Library

Key words: human blood pressure, hypertension, *ACE I/D* polymorphism, population isolate, island of Vis

Supervisor: prof. dr. sc. Nina Smolej Naran i

Rewievers: prof. dr. sc. Mirjana Kalafati , prof. dr. sc. Nina Smolej Naran i , prof. dr. sc.

Zdravko Dolenec, doc. dr. sc. Vesna Benkovi

Thesis accepted: 08.04.2009

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. Krvni tlak i hipertenzija</b>	1
1.1.1. Definicija hipertenzije	1
1.1.2. Reninsko-angiotenzinski sustav	2
<b>1.2. Nepromjenjivi imbenici rizika za razvoj hipertenzije</b>	4
1.2.1. Spol	4
1.2.2. Dob	5
1.2.3. Genetski utjecaj	5
<b>1.3. Promjenjivi imbenici rizika za razvoj hipertenzije</b>	6
1.3.1. Pušenje	6
1.3.2. Dislipidemija	7
1.3.3. Prekomjerna tjelesna masa	8
<b>1.4. Otkrivanje gena za kompleksne bolesti</b>	9
1.4.1. Vezanost gena	9
1.4.2. Neravnoteža vezanosti gena	10
<b>1.5. Populacijski izolati u geneti kim studijama i otok Vis kao primjer</b>	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	14
<b>3. UZORAK I METODE RADA</b>	15
<b>3.1. Uzorak</b>	15
<b>3.2. Ispitivana obilježja</b>	15
3.2.1. Fenotipska obilježja i puša ki status	15
3.2.2. Polimorfizam ACE I/D	16
<b>3.3. Statisti ka obrada</b>	17
3.3.1. Kvantitativne varijable	17
3.3.2. Kvalitativne varijable	17
<b>4. REZULTATI</b>	18
<b>4.1. Odnosi me u ispitivanim odrednicama krvnog tlaka</b>	18
4.1.1. Razlike u debljini, razini masno a u krvi, navici pušenja i krvnom tlaku me u spolovima	18
4.1.2. Utjecaj dobi, debljine, razine masno a u krvi i navike pušenja na krvni tlak	20
<b>4.2. Utjecaj ispitivanih odrednica krvnog tlaka na nastanak hipertenzije</b>	25
4.2.1. Razlike u debljini, razini masno a u krvi i navici pušenja izme u kontrolne skupine i skupine osoba s hipertenzijom	25
4.2.2. Razlike u razdiobi alela i genotipova polimorfizma ACE I/D izme u kontrolne skupine i skupine osoba s hipertenzijom	28
4.2.3. Me udjelovanje ispitanih odrednica na nastanak hipertenzije	30
<b>4.3. Usporedba utjecaja polimorfizma ACE I/D na nastanak hipertenzije u populaciji Visa i op oj populaciji Hrvatske</b>	32
<b>5. RASPRAVA</b>	34
<b>6. ZAKLJU AK</b>	39
<b>7. LITERATURA</b>	40

# 1. UVOD

## 1.1. Krvni tlak i hipertenzija

### 1.1.1. Definicija hipertenzije

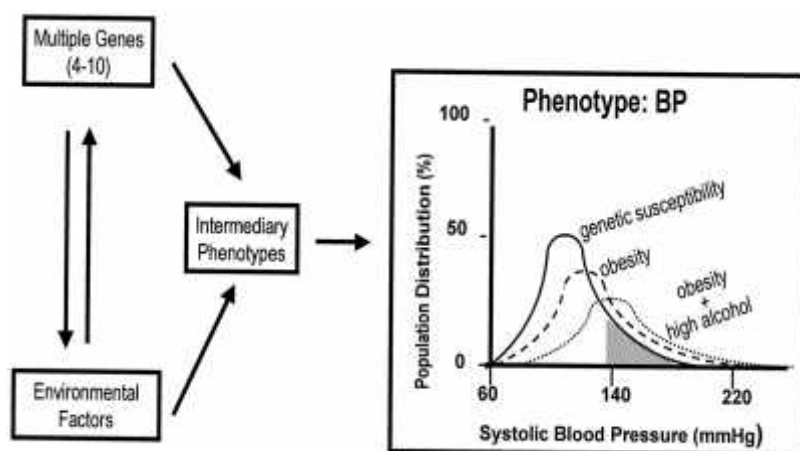
Krvni tlak je sila kojom krv djeluje na jedinicu površine stijenke žile (Guyton 2006). Ine ga sistoli ki tlak – maksimalna vrijednost za vrijeme sr ane sistole i dijastoli ki tlak – minimalna vrijednost za sr ane dijastole. Kada su ove vrijednosti iznad definiranih vrijednosti normalnog krvnog tlaka, dolazi do hipertenzije. Prema aktualnom kriteriju Svjetske zdravstvene organizacije (*The World Health Organization* – WHO) hipertenzija se definira kao stanje pri kojem krvni tlak premašuje 140/90 mmHg (Subcommittee 1999). Za fiziologiju krvnog tlaka može se postaviti jednostavna jednadžba: krvni tlak = sr ani minutni volumen (sr ani *output*) x ukupni periferni otpor (Vikrant i Tiwari 2001).

ak i umjereno povišenje arterijskog tlaka skra uje o ekivani životni vijek, a osoba s vrlo visokim arterijskim tlakom (srednji arterijski tlak 50% viši od normalne vrijednosti) može o ekivati da e živjeti još najviše nekoliko godina ako se primjereno ne lije i. Hipertenzija može uzrokovati smrt na tri na ina: pove ano radno optere enje srca vodi ranom razvoju zatajivanja srca i koronarnoj sr anoj bolesti, pa esto uzrokuje smrt zbog sr anog udara; visoki arterijski tlak esto uzrokuje moždani infarkt (ošte enje nekih od glavnih krvnih žila u mozgu, što prati odumiranje velikih djelova mozga), te ovisno o tome koji dio zahva a može uzrokovati paralizu, demenciju, sljepo u i mnoge druge poreme aje; visoki arterijski tlak gotovo uvijek uzrokuje ošte enje bubrega, koje naposljetku dovodi do zatajenja bubrega, uremije i smrti.

Otprilike 90 do 95% osoba koje boluju od hipertenzije ima *primarnu ili esencijalnu hipertenziju* koja predstavlja hipertenziju nepoznata podrijetla, za razliku od *sekundarnih* oblika kojima su uzroci poznati (npr. stenoza bubrežne arterije).

Neki bolesnici imaju izrazitu nasljednu sklonost prema razvoju hipertenzije. Prevalencija se hipertenzije razlikuje s obzirom na etni ki sastav populacije. Postoji utvr ena razlika u prevalenciji izme u Amerikanaca afri kog porijekla (koji pokazuju ve u prevalenciju) i ostalih etni kih skupina na oba ameri ka kontinenta (npr. Grell 1983, Ribeiro i sur. 1981, Lackland i Keil 1996). Nadalje prevalencija hipertenzije ovisi o dobi (ve a je u starijim dobnim skupinama), spolu (ve a prevalencija kod muškaraca) i socioekonomskom

statusu (obrnuto je proporcionalan s prevalencijom i smrtnoš u od hipertenzije) (Carretero i Oparil 2000).



Carretero, O. A. et al. *Circulation* 2000;101:329-335

**Slika 1.** Me udjelovanje genetskih i okolišnih faktora na razvoj hipertenzije

ini se da u ve ine bolesnika glavnu ulogu u nastanku hipertenzije imaju prekomjerna tjelesna masa i smanjena tjelesna aktivnost (slika 1). Istraživanja provedena na pripadnicima razli itih populacija upu uju na to da prekomjerna tjelesna masa i pretilost obuhva aju ak 65 do 70% rizi nih imbenika za razvoj hipertenzije (Guyton 2006). Ostali faktori koji neizravno utje u na regulaciju krvnog tlaka su rezistencija na inzulin, velik unos alkohola i/ili soli, starenje, stres te nedovoljan unos kalija i kalcija (Carretero i Oparil 2000). Krvni je tlak povezan i s koncentracijom kolesterola i triglicerida u krvi. Te su koncentracije obi no povišene u osoba oboljelih od hipertenzije te se smatraju rizi nim faktorom za nastanak hipertenzije.

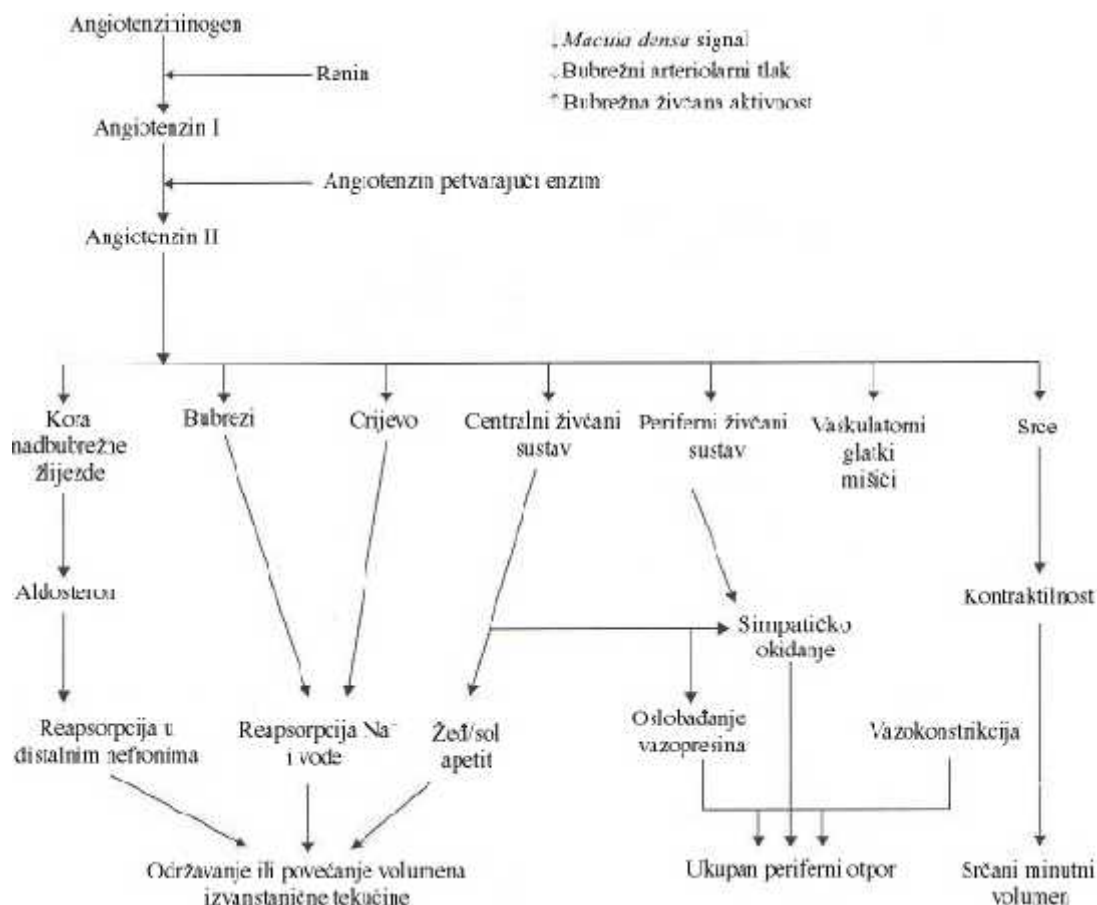
### 1.1.2. Reninsko-angiotenzinski sustav

Reninsko-angiotenzinski sustav (RAS) je hormonalni sustav koji sudjeluje u dugoro noj regulaciji krvnoga tlaka i krvnog volumena u tijelu.

Renin se sintetizira i zatim pohranjuje u junkstaklomerularnim stanicama (JG-stanice) bubrega u inaktivnom obliku, nazvanom prorenin. JG-stanice modificirane su glatke miši ne stanice, a smještene su u stjenci aferentnih arteriola tik do glomerula. Kada se snizi arterijski tlak, dolazi do razgradnje prorenina i osloba anja renina.



Renin je enzim i nije vazoaktivna tvar. Renin djeluje enzimatski na plazmatski globulin nazvan angiotenzinogen (AGT), od kojeg odvaja deka-peptid angiotenzin I (AGT I). AGT u najvećoj količini sintetizira i luči jetra. AGT I djeluje blago vazokonstriktorski, ali nedovoljno za znatnije promjene cirkulacijske funkcije. Renin ostaje u krvi od 30 minuta do 1 sat.



**Slika 2.** Shematski prikaz renin-angiotenzin sustava. Prikazani su glavni regulatori otpuštanja renina, biokemijska kaskada kojom se stvara angiotenzin II i glavni učinci angiotenzina II. Prilagođeno prema Vikrant i Tiwari (2001).

Unutar nekoliko sekunda nakon nastanka angiotenzina I od njega se odvajaju još dvije aminokiseline, pa nastaje okta-peptid angiotenzin II (AGT II). Ta se pretvorba gotovo potpuno odvija u plućima pod utjecajem angiotenzin-pretvarajućeg enzima (*angiotensin-converting enzyme*, ACE). ACE postoji u dvije forme, otopljen i vezan za membrane. Većina ACE-a je

vezana za membrane stanica različitih tkiva. AGT II djeluje preko receptora tipa 1 za angiotenzin II (AGTR), vezanog za G protein i raspoređenog u krvožilnim, bubrežnim i adrenalnim tkivima. AGTR posreduje u kontrakciji glatkih mišića i krvnih žila i sekreciji aldosterona. AGT II također se, u manjoj mjeri, veže za drugi receptor, receptor tipa 2 za angiotenzin II, koji uglavnom posreduje efekte suprotne od onih AGTR-a, ali njegova uloga nije još potpuno razjašnjena (Carey i Siragy 2003) (slika 2.). ACE također razgrađuje bradikinin koji je aktivni vazodilatator.

Dok se nalazi u krvi, AGT II može na dva načina povisiti tlak. Prvi je vazokonstrikcija u mnogim dijelovima tijela, koja nastaje brzo. Drugi je smanjenje izlučivanja soli i vode bubrežima, čime se postepeno povećava volumen izvanstanične tekućine i tijekom narednih sati i dana povisuje arterijski tlak. AGT II djeluje na bubrežno zadržavanje soli i vode izravno, te stimulacijom kore nadbubrežnih žlijezda koje luče aldosteron (uzrokuje povećanu reapsorpciju soli i vode u bubrežnim kanalima).

Poremećaj u bilo kojoj komponenti ove kaskade može dovesti do trajnog povećanja krvnog tlaka, tj. do nastanka hipertenzije.

## **1.2. Nepromjenjivi čimbenici rizika za razvoj hipertenzije**

### **1.2.1. Spol**

Hipertenzija je češća kod muškaraca starosti između 30 i 45 godina nego žena te dobi, što upućuje na spolne razlike u fiziološkom kontrolnom mehanizmu krvnoga tlaka. Također je češća kod žena nakon menopauze te se daje naslutiti da je riječ o zaštitnom utjecaju inkretnih spolnih hormona na kardiovaskularni sustav (Dubey i sur. 2004, Orshal i Khalil 2004).

Na pokusima sa štakorima je dokazano da postoji razlika u jačini kontrakcije vaskularnih glatkih mišića, a razlog tome bi mogao biti utjecaj estrogena. Naime, zabilježena je jača vazokonstrikcija kod mužjaka, neovisno o tome jesu li kastrirani ili ne, i kod ženki kojima su izvađeni jajnici (Crews i Khalil 1999, Kanashiro i Khalil 2001). Estrogen koči rast i umnožavanje glatkih mišićnih stanica, a potiče umnažanje stanica endotela krvnih žila (Dubey i sur. 1999, Barchiesi i sur. 2002).

Estrogen utječe na pojačanu sintezu i bioaktivnost dušikovog oksida (NO) i prostaciklina (PGI<sub>2</sub>), koji su značajni relaksirajući faktori endotelnog porijekla (Forte i sur. 1998, Orshal i Khalil 2004). Isto tako smanjuje oslobađanje kontrahirajućih faktora kao što su endotelin-1 (ET-1) i tromboksan A<sub>2</sub> (Orshal i Khalil 2004).

Poznato je i da estrogen regulira neke komponente samog RAS-a. Unutar gena za angiotenzinogen pronađen je promotor kojeg može regulirati estrogen (*estrogen-responsive promotor*) (Gordon i sur. 1992). Aktivnost RAS-a, dakle, može biti modulirana s obzirom na spol i estrogenski status (Schunkert i sur. 1997).

### **1.2.2. Dob**

Ljudski organizam starenjem biva sve više izložen nepovoljnim utjecajima okoline i posljedica su i komplikacije na svim organskim sustavima, pa tako i na srcu i krvnim žilama. Primjerice, starenjem se mijenja struktura kolagena u stjenkama krvnih žila te one postaju manje elastične. Dobra im udjeluju i s drugim rizicima i imbenicima utječe na nastanak hipertenzije.

### **1.2.3. Genetski utjecaj**

Praćenjem osoba s esencijalnom hipertenzijom dokazana je i jasna nasljedna sklonost. Nerijetko jedan ili čak oba roditelja, kao i bliski srodnici osobe s otkrivenom hipertenzijom imaju povišen krvni tlak. Čak i podatak kako je neki od roditelja umro od moždanog udara upućuje s velikom sigurnošću na postojanje povišenoga krvnog tlaka u obitelji, jer je moždani udar najčešće izazvan upravo povišenim krvnim tlakom.

Identifikacija gena koji doprinose razvoju kompleksne hipertenzije otežana je činjenicom da su dva fenotipa koji određuju krvni tlak, srčani minutni volumen i ukupni periferni otpor, kontrolirani intermedijarnim fenotipovima koji uključuju autonomni živčani sustav, vazopresor/vazodepresor-hormone, strukturu kardiovaskularnog sustava, volumen tjelesne tekućine, bubrežnu funkciju i mnoge druge. Svi ti intermedijarni fenotipovi su također kontrolirani kompleksnim mehanizmima, tako i krvni tlak. Dakle, postoji veliki broj gena koji bi mogli sudjelovati u razvoju kompleksnih oblika hipertenzije (Carretero i Oparil 2000).

U ovom istraživanju smo se usmjerili na reninsko-angiotenzinski sustav (RAS), odnosno na utjecaj gena za angiotenzin-pretvarajućeg enzima (ACE) koji spada u najintenzivnije proučavane kandidatske gene u ljudskoj kardiovaskularnoj patofiziologiji.

## **Gen za angiotenzin pretvaraju i enzim (ACE)**

Angiotenzin pretvaraju i enzim (ACE) se smatra ključnom komponentom reninsko-angiotenzinskog sustava (RAS) za razjašnjenje patogeneze hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti (Nakai i sur. 1994). Gen za ACE smješten je na 17. kromosomu, sadrži 26 eksona i dugačak je 20.370 baza (Hubert i sur. 1991).

Rigat i sur. (1990) su zabilježili da je čak 47% fenotipske varijabilnosti ACE-koncentracije u plazmi povezano s *ACE I/D* polimorfizmom i time potvrdili da je ACE lokus u tom pogledu najvažniji. Srednja koncentracija plazmatskog ACE kod osoba *DD* genotipa je bila duplo veća od osoba *II* genotipa, dok su osobe *ID* genotipa bile srednje vrijednosti. U svojoj studiji iz 1992. godine otkrili su da ACE insercija predstavlja *Alu* ponavljanje u sekvencu dugačku 287 pb u 16. intronu ACE gena.

Jeffrey i sur. (1999) su u svojoj studiji otkrili znatno niže koncentracije ACE-a u osoba *II* genotipa od genotipova *ID* i *DD*. Također su otkrili da razlike između grupa genotipova *ID* i *DD* nije bilo, te došli do zaključka da je *D* alel dominantan u odnosu na *I* alel.

*ACE I/D* polimorfizam nema poznati funkcionalni učinak, ali se smatra da je u linkage disequilibriumu (LD-u) s funkcionalnom varijantom koja izravno uvjetuje ACE-koncentraciju i mogući daljnji razvoj bolesti (Tiret i sur. 1992).

## **1.3. Promjenjivi čimbenici rizika za razvoj hipertenzije**

### **1.3.1. Pušenje**

Pušenje povećava krvni tlak i broj otkucaja srca u minuti. Ovaj efekt se većim dijelom pripisuje djelovanju nikotina. Povišenje tlaka uzrokuje povećanje srčanog minutnog volumena kao i povećanje ukupnog perifernog otpora. Većine epidemiološke studije su pokazale blago snižene vrijednosti krvnog tlaka kod pušača u odnosu na nepušače i bivše pušače (Omvik 1996, Green i sur. 1986). Ta činjenica se smatra paradoksalnom, budući da pušenje duhana akutno povećava krvni tlak (Omvik 1996), te se smanjuje kod pušača koji su prestali pušiti na sedam dana (Minami i sur. 1999). Fogari i sur. (1996) su u svojoj studiji kod pušača zabilježili povišene vrijednosti sistoličkog tlaka, ali zato niže vrijednosti dijastoličkog tlaka.

Pretpostavlja se da bi jedan od razloga za paradoks vezan uz prestanak pušenja i hipertenziju mogao biti povećanje tjelesne mase nakon prestanka pušenja. Naime, dokazano je povećanje tjelesne mase nakon prestanka pušenja (Perkins 1993), kao i njezin slabiji porast

tijekom godina kod pušača u odnosu na nepušače (Rasmussen i sur. 2003). John i sur. (2006) su u svojoj studiji došli do zaključka da prestanak pušenja ne vodi do povišenog krvnog tlaka kod populacije normalne tjelesne mase.

### 1.3.2. Dislipidemija

Dislipidemija je poremećaj u metabolizmu lipoproteina, uključujući i preveliku proizvodnju lipoproteina kao i njihov nedostatak. Dislipidemija uzrokuje oštećenje endotela i gubitak fiziološke vazomotorne aktivnosti, što bi moglo imati za posljedicu povišenje krvnog tlaka (Nickening 2002, Nickening i Harrison 2002, Halperin i sur 2006).

Kolesterol je masno i topljiva samo u mastima. Da bi se mogao prenositi putem krvi koja se većim dijelom sastoji od vode, kolesterol se prenosi zajedno s posebnim bjelancevinama. Taj spoj nazivamo lipoproteinima. Postoji više vrsta lipoproteina, a najvažnije su dvije: lipoproteini niske gustoće (low-density lipoproteins, LDL) koji prenose i odlažu kolesterol u pojedina tkiva i organe, te lipoproteini visoke gustoće (high-density lipoproteins, HDL) koji prenose suvišan kolesterol iz drugih tkiva u jetru.

Trigliceridi su spojevi alkohola i masnih kiselina. Unosimo ih hranom, ali se i nalaze pohranjeni u masnim stanicama tijela. Kada organizam želi iskoristiti mast iz hrane ili masnih pričuva, mora trigliceride najprije enzimima razgraditi na *glicerol i masne kiseline*. Razgradni proizvodi se iskorištavaju u metabolizmu – glicerol se pretvara u glukozu koja se može iskorištavati za stvaranje energije ili izgradnju drugih tvari, a masne kiseline se razgrađuju do jednostavnijih pričuva tako da nastaje energija. Obrnuto, ako jedemo previše hrane koja sadrži ugljikohidrate, suvišak se preko glicerola pretvara u trigliceride i pohranjuje u masnom tkivu kao dio tjelesne mase.

Hipertenzija se često povezuje s drugim kardiovaskularnim čimbenicima rizika kao što su pretilost, dijabetes i dislipidemija (Reaven i sur. 1996). Disfunkcija endotela, kao posljedica djelovanja ovih čimbenika rizika, bi mogla imati ulogu u patofiziologiji hipertenzije (Oparil i sur. 2003).

Halperin i sur. (2006) su u svojoj studiji zabilježili da su visoka razina ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola, kao i visok omjer ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola nezavisno povezani s povećanjem rizika za pojavu hipertenzije u naizgled zdravih muškaraca. Također su došli do zaključka da visoka razina HDL-kolesterola smanjuje rizik za nastanak hipertenzije. Zaključili su da povišena razina lipida uzrokuje ranije pojavljivanje hipertenzije za više godina. Utjecaj je ostao isti i nakon isključenja čimbenika kao što su dijabetes i

pretilost. Kako bi dokazali da razina kolesterola utječe na krvni tlak, Borghi i sur. (2004) su napravili petogodišnju studiju u kojoj su pacijente s hipertenzijom tretirali lijekovima za sniženje razine kolesterola. Posljedica je bila značajno sniženje krvnog tlaka.

Disfunkcija endotela smanjuje proizvodnju i aktivnost dušikovog oksida (NO), te uzrokuje promjene u ekspresiji endotelin-1, kao i endotelin A i B receptora (Nohria i sur. 2003). Iz navedenih razloga izostaje adekvatan odgovor na promjenu intervaskularnih uvjeta u obliku vazokonstrikcije ili -dilatacije. Izostanak vazodilatacije na stimulus imao bi za posljedicu povišenje krvnog tlaka (Oparil i sur. 2003). Nickenig i Harrison (2002) su povezali lipide i hipertenziju preko mehanizma za hiperekspresiju angiotenzina I. Abnormalnosti u metabolizmu lipida i otpornost na inzulin su povezani sa simpatikom hiperfunkcijom, što bi također moglo imati utjecaj na razvoj hipertenzije (Egan 2003).

U sedmogodišnjoj studiji sa uzorkom od 1039 ljudi, koji u početku nisu pokazivali simptome dijabetesa ili hipertenzije, pokazalo se da rizični faktori za aterosklerozu, koji uključuju trigliceride, također utječu na pojavu hipertenzije (Haffner i sur. 1996).

### **1.3.3. Prekomjerna tjelesna masa**

Prekomjerna tjelesna masa opterećuje tijelo ne samo u smislu bržeg propadanja kostiju i zglobova, već i metabolički. Masno tkivo u organizmu opterećuje cirkulaciju te povećava otpor optoku krvi. Redovito je povezana s tjelesnom neaktivnošću.

Prekomjerna tjelesna masa je u ovom istraživanju izražena indeksom tjelesne mase (*body mass index*, BMI) koji predstavlja omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima ( $\text{kg/m}^2$ ).

Hipertenzija gotovo uopće nije prisutna kod mršavih ruralnih afričkih populacija, dok je postala sve češća kod urbanih afričkih populacija, a izrazito je česta u pretežno pretilim populacijama crnaca iz zapadnih zemalja. Ova činjenica je navela Bunkera i sur. (1995) na to da istraže postojanje praga iznad kojeg tjelesna masa utječe na krvni tlak. U svojoj studiji su došli do zaključka da prag ispod kojeg indeks tjelesne mase (BMI) ne korelira s krvnim tlakom iznosi  $21,5 \text{ kg/m}^2$ . Mufunda (2007) u svojoj studiji dolazi do zaključka da postoje različiti pragovi BMI-a kod kojih se pojavljuje veza između BMI-a i krvnog tlaka ovisno o populaciji. Populacije s višim prosječnim BMI-om imaju veću učestalost povišenog krvnog tlaka kod dijela populacije s niskim BMI-om, te za takve populacije kaže da imaju dvostruko podrijetlo visokog krvnog tlaka (za dio populacije s niskim i s visokim BMI-om). Isto tako su

kod nekih populacija zabilježene pozitivne korelacije krvnog tlaka i BMI-a samo u dijelu populacije s normalnim BMI-om (Mufunda i sur. 2006).

Mufunda i sur. (2006) su u svojoj studiji zabilježili veći i utjecaj BMI-a na krvni tlak kod muškaraca nego kod žena, pogotovo onih starijih od 45 godina. Zaključili su da BMI i dob imaju sinergistički ulogu u stvaranju snažne asocijacije s krvnim tlakom.

#### **1.4. Otkrivanje gena za kompleksne bolesti**

Metode koje se koriste za otkrivanje gena odgovornih za nastanak određene bolesti zasnivaju se na određivanju genomske regije koja s tom bolesti kosegregira, bilo u rodoslovljima, bilo u populaciji. Osnovna podjela tih metoda temelji se na postojanju dva fenomena koji omogućuju njihovu primjenu. To su vezanost gena (*linkage*) i neravnoteža vezanosti gena (*linkage disequilibrium*).

##### **1.4.1. Vezanost gena**

Tijekom mejoze se genetički materijal u roditeljskom setu kromosoma rekombinira i prenosi u gamete tako da svaka sadrži jedinstveni set gena. Genetička rekombinacija je posljedica ili nezavisne segregacije kromosoma ili *crossing-overa* između vezanih gena u bivalentu. Vezani geni se ne segregiraju nezavisno, jer su smješteni na istom kromosomu, te se tijekom mejoze nasljeđuju zajedno (u bloku). Neki su geni toliko udaljeni međusobno da se *crossing-over* događa vrlo često. Uestalost rekombinacije je odraz udaljenosti gena na kromosomu, što znači da je veća vjerojatnost da će geni biti razdvojeni *crossing-overom* ako su geni udaljeniji i obrnuto. Znači ako su dva lokusa smještena jedan blizu drugoga na kromosomu, mala je vjerojatnost da će ih *crossing-over* rastaviti. Zbog toga njihovi aleli ne segregiraju neovisno, nego se zajedno nasljeđuju u više od 50% slučajeva, te je rekombinacijska frekvencija manja od 0,5. Za takve se lokuse kaže da su vezani. Alfred Sturtevant, jedan od Morganovih studenata i suradnika, predložio je da 1% uestalosti rekombinacije predstavlja relativnu jedinicu udaljenosti između dva gena, te se danas u čast Morganu izražava u 1cM (centimorgan). Odnos između cM i parova baza u DNA je visoko varijabilan, te ovisi o vrsti, spolu i regiji na kromosomu.

Kada je pozicija jednog lokusa u genomu poznata, fenomen vezanosti gena koristi se kako bi se procijenila relativna udaljenost kromosomske pozicije drugog lokusa u odnosu na prvi. To je osnova analize vezanosti gena koja se koristi za kartiranje nepoznate lokacije gena

odgovornih za različite fenotipove (uključujući i bolesti) u odnosu na veliki broj biljega tj. lokusa, koje su pozicije u genomu poznate (Terwilliger i Goring 2000).

Za istraživanje mendelskih (monogenskih) bolesti koriste se parametrijske metode analize vezanosti gena, pri čemu se određuju svi potrebni parametri (model nasljeđivanja, frekvencija gena i prodornost svakog gena).

Kod kompleksnih bolesti teško je procijeniti parametre potrebne za takvu analizu vezanosti gena. U studijama kompleksnih bolesti češće se koriste neparametrijske metode koje se temelje na analizi vezanosti gena i zahtijevaju usporedbu opaženog pojavljivanja istih alela na proučavanom lokusu kod srodnika i očekivanog pojavljivanja alela s obzirom na mendelsku segregaciju.

### 1.4.2. Neravnoteža vezanosti gena

Asocijacija između određenog polimorfizma i fenotipa postoji ne samo u slučaju kada taj polimorfizam uvjetuje fenotip, nego i u slučaju kada je on smješten blizu alela koji uvjetuje taj fenotip, a takva vrsta asocijacije pojavljuje se kao posljedica neravnoteže vezanosti gena (*linkage disequilibrium, LD*) (Goldstein i sur. 2001, Kruglyak 1999).

Neravnoteža vezanosti gena neslučajna je asocijacija alela na različitim lokusima. Ona nastaje kao posljedica povijesnih mutacija, migracija, ušinka uskog grla (*bottleneck effect*) ili drugih populacijskih genetičkih događaja (Lander i Schork 1994). Kada neka mutacija koja je odgovorna za bolest po prvi put uđe u populaciju, kao novi događaj u nekom pojedincu, ona je u LD-u s cijelim genomom te osobe. Kako se mutacija prenosi kroz generacije, aleli na lokusima koji su tijesno vezani uz lokus na kojem je mutacija, prenose se zajedno s mutacijom, dok se aleli na udaljenijim lokusima zamjenjuju putem rekombinacije te se LD smanjuje (Page i Amos 1999).

Veličina LD-a između dva lokusa ovisna je o rekombinacijskoj frakciji ( $r$ ) i vremenu u generacijama ( $t$ ):

$$D_t = D_o (1 - r)^t,$$

gdje je  $D_o$  vrijednost LD-a u početnoj ili osnivačkoj populaciji.

Asocijacijske studije populacijski su analog analize vezanosti gena u obiteljima, ali koriste prednost bogatije populacijske povijesti mejozičkih događaja što omogućuje bolju



rezoluciju genskog mapiranja (Luo i sur. 2000). Zbog toga se LD-studije primjenjuju za precizno kartiranje (*fine mapping*) gena, nakon što je analizom vezanosti gena određena regija unutar koje se ti geni nalaze (Terwilliger i Weiss 1998). Regija, odnosno gen koji je objekt istraživanja u asocijacijskoj studiji također može biti odabran i na temelju poznate funkcije njegovog produkta u patofiziologiji bolesti koja se istražuje. U tom slučaju se ti geni nazivaju kandidatskim genima.

U asocijacijskim se studijama kao genetički biljezi najčešće koriste jednonukleotidni polimorfizmi (*single nucleotide polymorphisms*, SNP). SNP-i su pozicije unutar genoma na kojima se dvije alternativne baze (dva alela) pojavljuju u značajnim frekvencijama (više od 1%) (Wang i Lander 1998). Predstavljaju najčešći tip ljudskih genetičkih varijacija te su, zbog tako velike zastupljenosti u genomu i male brzine mutiranja, najpogodniji izbor biljega za primjenu asocijacijskih studija (Kruglyak 1999, Wang i Lander 1998).

Danas se istraživanja gena za kompleksne bolesti sve više prebacuju na istraživanje haplotipova, umjesto pojedinačnih SNP-ova, jer ih karakterizira veća informativnost. Haplotip je kombinacija alelnih stanja polimorfničkih biljega duž jednog isječka iste DNA-molekule (Jobling i sur. 2004). Nedavne studije koje su istraživale LD, analiziraju i SNP-haplotipne strukture autosomalnih regija, pretpostavile su postojanje struktura nalik blokovima za bar dio genoma. Haplotipni blokovi pojavljuju se kao segmenti nizova alela koji se nasljeđuju zajedno. LD je velik unutar blokova, ali je puno manji između blokova. Obrnuto, haplotipna je raznolikost mala unutar blokova, ali velika duž granica između blokova (Cardon i Abecasis 2003, Stumpf i Goldstein 2003). Ako je ova struktura nalik blokovima uobičajena karakteristika duž genoma, onda će poznavanje takvih blokova imati važan utjecaj na identificiranje gena za kompleksne bolesti i tretiranje regija autosomalnih kromosoma kao male verzije mtDNA ili Y kromosoma u filogeografskim studijama (Jobling i sur. 2004).

Veliki projekt, HapMap (*Haplotype Map*), započet je sa svrhom određivanja haplotipne blokovne strukture unutar genoma. Cilj je identificirati 300.000 do 600.000 pažljivo selektiranih SNP-ova (*tag SNPs*) koji su dovoljni za karakterizaciju blokovne strukture. U asocijacijskim studijama, nadalje, može se koristiti samo ti SNP-ovi za skeniranje većine genoma (Jobling i sur. 2004).

## 1.5. Populacijski izolati u genetici kim studijama i otok Vis kao primjer

Otok Vis je pogodan za ovo istraživanje budući da je primjer populacijskih izolata koji su pogodni za istraživanje genetičke podloge kompleksnih obilježja od kojih su najčešći i predmet interesa kompleksne bolesti. Prema definiciji, populacijski izolat osniva mala skupina osnivača, a tokom vremena njegova veličina varira (tzv. efekt uskog grla, engl. *bottleneck effect*). Pritom dolazi i do genetičkog pomaka (*genetic drift*) kojim se neki od recesivnih alela gube, dok se drugi javljaju s većom učestalošću. Na taj je način svaki populacijski izolat specifičan u svojim recesivnim svojstvima, odnosno recesivnim bolestima. Još jedna osobitost izolata je visok stupanj srođivanja (*inbreeding*) koji smanjuje njihovu genetičku varijabilnost i time olakšava potragu za genetičkim varijantama odgovornim za pojavu kompleksnih svojstava. Također bitna stavka je da pripadnici populacije izolata dijele zajedničko okoliš što je izuzetno važno s obzirom da je fenotip kompleksnih svojstava pod utjecajem genetičkih i okolišnih čimbenika te njihova međudjelovanja.

U hrvatskoj se već trideset godina provode antropogenetička istraživanja populacijske strukture suvremenih ljudskih zajednica i genetičkih izolata jadranskih otoka (Rudan i sur. 1987, 1992, 2004). Cilj im je razumijevanje biološke povijesti i podrijetla, obrazaca naseljavanja, stupnja reproduktivne izoliranosti, filogenetičkih odnosa kao i učestalost pojavljivanja nekih kompleksnih svojstava (npr. bolesti) u proučavanjima populacijama. U sklopu tih istraživanja provedena su i molekularna genetička istraživanja populacijske strukture upotrebom mikrosatelitskih biljega, mitohondrijske i Y DNA (Martinović i sur. 1998, Tolkić i sur. 2000, Bara i sur. 2003, Perić i sur. 2005) koja su uključila i srednjedalmatinske otoke. Utvrđena reducirana genetička varijabilnost, odnosno smanjena ukupna heterozigotnost i visok stupanj ukupnog srodstva stanovništva srednjedalmatinskih otoka u usporedbi s općom populacijom Hrvatske. Takva populacijska struktura posljedica je reproduktivne izoliranosti i visokog stupnja endogamije uslijed različitih zemljopisnih, političkih, gospodarskih i demografskih značajki. Daljnja istraživanja koja su provedena u tim populacijama koristila su upravo izoliranost kao njihovu osobitost da bi se razmatrala genetička podloga kompleksnih svojstava (Rudan i sur. 1999, 2002, Campbell i sur. 2007). Rezultati su pokazali da visok stupanj srodstva utječe na povećanu učestalost pojavljivanja kompleksnih bolesti koje se javljaju u kasnoj dobi kao što je koronarna bolest, bubrežni kamenci, hipertenzija, moždani udar, rak, uni/bipolarni poremećaji, astma, giht, iritacija želuca i osteoporoza (Rudan 1999, Smolej Naranjčić i Rudan 2001, Rudan i sur. 2002, 2003a,b, 2004). Takvi su nalazi objašnjeni

povećanom homozigotnošću u na mnogim genetičkim lokusima s malim negativnim utjecajem na homeostatske puteve što rezultira povećanim rizikom za obolijevanje.

Otok Vis spada u najudaljenije naseljene otoke u Jadranu. Njegovo naseljavanje datira iz ilirskog razdoblja, otprilike 1000 godina prije Krista, kasnije je slijedilo naseljavanje grčkog (4. st. p.n.e.), rimskog (3. st. p.n.e.) i napokon hrvatskog stanovništva (7.st.). Kasniji valovi useljavanja s kopna uslijedili su u 16. i 17. stoljeće u nakon turskih osvajanja. Od 1910. godine broj stanovnika u stalnom je padu, što je posljedica iseljavanja i izrazito visokih stopa mortaliteta pa Vis ima narušenu dobno-spolnu strukturu stanovništva i smanjenu biodinamiku (Škreblin i sur. 2002). Posljednje veliko smanjenje populacije za 53 % dogodilo se prije 25 godina što je uzrokovalo noviji efekt uskog grla (Vitart et al. 2006).

Uzevši hipertenziju u obzir, već je dokazano da postoji visoka prevalencija hipertenzije u srednjodalmatinskim otocima u populacijama (Škarić-Jurić i Smolej Naranj i 2003, Škarić-Jurić i sur. 2003). Ovdje treba posebno istaknuti populaciju otoka Visa gdje je izrazito unata prevalencija razvijene hipertenzije (sistoliki tlak  $\geq 160$  mmHg i/ili dijastoliki tlak  $\geq 95$  mmHg) čak 40,4%. Kompleksne segregacijske analize potvrdile su hipotezu *major gene* (*major gene hypothesis*) u populaciji otoka Visa, tj. postojanje *major* gena koji objašnjava 42% varijacije sistoličkog odnosno 47,6% dijastoličkog krvnog tlaka (Škarić-Jurić i sur. 2003). Ove karakteristike otocne populacije otoka Visa, kao i ostale otocne izolirane populacije Jadrana, idealnim su za nastavak proučavanja genetike podloge hipertenzije bilo analizom vezanosti gena, bilo asocijacijskom studijom.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je utvrditi utjele li *ACE I/D* polimorfizam, kao primjer genetičkog imbenika koji se nalazi unutar jednog od gena odgovornog za regulaciju krvnog tlaka, na krvni tlak uvijek, s naglaskom na nastanak hipertenzije. Preostali nepromjenjivi imbenici izuavani u ovom radu su spol i dob, a uz njih izuavani su promjenjivi, u širem smislu okolišni, imbenici: debljina, razina masnoća u krvi i navika pušenja. Pri tome je korištena populacija otoka Visa koja se zbog svoje izoliranosti smatra izuzetno pogodnom za istraživanja kompleksnih poremećaja kao što je hipertenzija. Krajni cilj ovog istraživanja je bolje razumijevanje mehanizma razvoja hipertenzije.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

1. Proučiti odnose među odrednicama krvnog tlaka u stanovništvu otoka Visa, i to:
  - Proučiti spolni dimorfizam u debljini, razini masnoća u krvi i navici pušenja te krvnom tlaku
  - Ispitati utjecaj dobi, debljine, razine masnoća u krvi i navike pušenja na krvni tlak
2. Ispitati utjecaj ispitivanih odrednica krvnog tlaka na nastanak hipertenzije, i to:
  - Utvrditi razlike u debljini, razini masnoća u krvi i navici pušenja između kontrolne skupine i skupine osoba s hipertenzijom
  - Utvrditi razlike u razdiobi alela i genotipova *I/D* polimorfizma *ACE* gena između kontrolne skupine i skupine osoba s hipertenzijom
  - Procijeniti utjecaj međudjelovanja ispitivanih odrednica na nastanak hipertenzije
3. Usporediti utjecaj *ACE I/D* polimorfizma na nastanak hipertenzije u populaciji Visa i općoj populaciji Hrvatske

### **3. UZORAK I METODE RADA**

#### **3.1. Uzorak**

Ovo je istraživanje provedeno na Institutu za antropologiju u okviru projekta «Kompleksna obilježja i zdravlje stanovništva od djetinjstva do duboke starosti» (196-1962766-2747). Korišten je uzorak iz baze podataka Instituta koja je rezultat dugogodišnjih antropoloških istraživanja populacija Sjeverne i Srednje Dalmacije (npr. Rudan i sur., 1992, 2004) i sadrži podatke o nizu sociokulturnih i bioloških svojstava otoka i obalnih populacija tog područja. Podaci koji su obuhvaćeni u ovom radu prikupljeni su u odraslom stanovništvu otoka Visa u veljači 2002. godine. Uzorak je sastavljen od 140 osoba, stanovnika gradova Komiza i Visa, i to 80 žena i 60 muškaraca, dobnog raspona od 40 do 81 godine starosti. Uzorak čine dvije skupine – ispitivana i kontrolna. Ispitivanu skupinu čine 70 osoba koje boluju od hipertenzije sa sistoličkim tlakom vrijednosti 140 mmHg ili više i/ili dijastoličkim tlakom vrijednosti 90 mmHg ili više. Kontrolnu skupinu čine također 70 osoba i ona odgovara ispitivanoj skupini prema dobi, spolu i mjestu boravka.

#### **3.2. Ispitivana obilježja**

##### **3.2.1. Fenotipska obilježja i pušački status**

U radu su, osim dobi i spola, za svakog ispitanika korišteni podaci o arterijskom krvnom tlaku, visini i masi tijela, razini masnoća u krvi te podaci o navici pušenja.

Mjerenje krvnog tlaka (sistoličkog i dijastoličkog) provedeno je u sjedećem položaju od strane iskusnog i educiranog ispitivača upotrebom živinog tlakomjera. Drugo mjerenje krvnog tlaka uzeto je kao vjerodostojno i to nakon što je ispitanik prethodno sjedio 10-15 minuta. Mjerenje je provedeno u skladu s smjernicama Europskog društva za hipertenziju iz 2003. godine. Krvni tlak analiziran je kao kvantitativno (vrijednosti nisu grupirane u kategorije) i kvalitativno obilježje (vrijednosti su grupirane u kategoriju normalnog tlaka i kategoriju povišenog tlaka odnosno hipertenzije). Kriteriji za hipertenziju bili su: 1.) sistolički tlak  $\geq 140$  mmHg i/ili dijastolički tlak  $\geq 90$  mmHg i/ili 2.) liječena hipertenzija.

Visina i masa tijela korištene su za izračunavanje indeksa tjelesne mase (BMI) kao omjera mase i visine tijela prema izrazu:  $BMI = \text{masa (kg)} / \text{visina}^2 (\text{m}^2)$ .

Puša ki status odre en je kvalitativno (puša , nepuša ) i kvantitativno (broj popušenih cigareta na dan, broj godina pušenja i indeks pušenja). Indeks pušenja tzv. *packyear* izra unat je na temelju broja kutija popušenih cigareta dnevno i broja godina pušenja prema izrazu:

$$\text{Indeks pušenja} = (\text{broj cigareta na dan} / 20) \times \text{broj godina pušenja}.$$

Uzorci periferne krvi ispitanika, prikupljene na terenskim istraživanjima, pohranjeni su u staklenim epruvetama (10 ml) s dodatkom 200 µl antikoagulansa (EDTA) na -18°C do izolacije DNA. Izolacija DNA i analiza *ACE I/D* polimorfizma obavljene su u laboratoriju Instituta za antropologiju u Zagrebu.

- Klice: F (naprijed) 5'-CTGGAGACCACTCCATCCTTTCT-3'  
R (natrag) 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'

- PCR program: 94 °C, 1 min  
58 °C, 2 min  
72 °C, 2 min } 30 ciklusa

16

### 3.3. Statisti ka obrada

#### 3.3.1. Kvantitativne varijable

- a) Osnovne karakteristike kvantitativnih varijabli prikazati e se deskriptivno-statisti ki pokazateljima: srednja vrijednost ( $\bar{X}$ ) i standardna devijacija (SD).
- b) Razlike izme u skupina ispitanika koje se uspore uju testirati e se univarijatnom analizom varijance.
- c) Odnosi izme u varijabli utvrditi e se izra unavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije.
- d) Multivarijatna analiza provesti e se primjenom logisti ke regresije koja omogu ava izra un omjera šanse (engl. *Odds Ratio*).

#### 3.3.2. Kvalitativne varijable

- a) Za svaku varijablu izra unati e se u estalost (frekvencija) pojedine karakteristike.
- b) Razlike izme u o ekivane i izmjerene u estalosti istodobnog javljanja pojedinih kvalitativnih obilježja testirati e se  $\chi^2$ -testom.
- c) Za *ACE I/D* polimorfizam izra unati e se u estalost *I* i *D* alela te *DD*, *ID* i *II* genotipova. O ekivane frekvencije (homozigota i heterozigota) izra unati e se iz alelnih frekvencija.

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

gdje su  $p$  i  $q$  alelne frekvencije,  $p^2$  i  $q^2$  frekvencije homozigota, a  $2pq$  frekvencija heterozigota. O ekivani broj homozigota i heterozigota dobiven je množenjem frekvencija s ukupnim brojem ispitanika.

Podudaranje opažene u estalosti i one o ekivane prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži testirati e se  $\chi^2$ -testom.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Za ovaj izra un korišten je program dostupan na

<http://www.webcalculator.co.uk/statistics/x2f91.htm>.

Sve su ostale statisti ke analize provedene upotrebom programa SPSS, release 10.0.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Odnosi me u ispitivanim odrednicama krvnog tlaka

#### 4.1.1. Razlike u debljini, razini masnoća u krvi, navici pušenja i krvnom tlaku me u spolovima

U tablici 4.1.1.1. prikazane su za svaki spol srednje vrijednosti i standardne devijacije sistoličkog i dijastoličkog tlaka i njihovih potencijalnih odrednica. To su dob, indeks tjelesne mase (BMI), koncentracija HDL-a, ukupnog kolesterola, triglicerida, broj dnevno popušenih cigareta, godine pušenja i indeks pušenja. Razlike između muškaraca i žena testirane su analizom varijance. Kako je u tablici vidljivo, statistički značajna razlika među spolovima utvrđena je samo za koncentraciju triglicerida ( $p=0,027$ ) koja je značajno viša kod muškaraca.

Razlike u pušačima između muškaraca i žena testirane su  $\chi^2$ -testom i nije dobivena statistički značajna razlika (tablici 4.1.1.2.). Polovina ispitanika u uzorku bili su pušači.

**Tablica 4.1.1.1.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije dobi, potencijalnih odrednica krvnog tlaka kao i sistoličkog i dijastoličkog tlaka kod muškaraca i žena te njihova usporedba analizom varijance

	<b>muškarci N= 60</b>	<b>žene N= 80</b>	<b>F (df); p</b>
<b>Dob</b> (godine)	56,8 ± 11,5	57,6 ± 9,5	0,20 (1; 138); 0,653
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	27,9 ± 3,7	27,5 ± 4,1	0,54 (1; 138); 0,464
<b>HDL</b> (mmol/l)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,04 (1; 138); 0,839
<b>Kolesterol</b> (mmol/l)	6,7 ± 1,4	7,4 ± 6,3	0,63 (1; 138); 0,428
<b>Trigliceridi</b> (mmol/l)	1,7 ± 1,1	1,4 ± 0,7	<b>4,97 (1; 138); 0,027</b>
<b>Broj cigareta/dan</b>	12,0 ± 16,8	7,8 ± 11,8	3,14 (1; 138); 0,072
<b>Godine pušenja</b>	12,7 ± 16,1	10,7 ± 13,9	0,58 (1; 138); 0,447
<b>Indeks pušenja</b>	14,0 ± 22,3	10,3 ± 18,2	1,15 (1; 138); 0,285
<b>Sistol. tlak</b> (mmHg)	142,6 ± 18,8	138,6 ± 21,8	1,12 (1; 138); 0,293
<b>Dijastol. tlak</b> (mmHg)	89,3 ± 9,1	87,5 ± 8,9	1,42 (1; 138); 0,236



**Tablica 4.1.1.2.** Uestalost puša a i nepuša a kod muškaraca i žena

	<b>Puša</b>	<b>Nepuša</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Muškarci</b>	33 55,0 %	27 45,0 %	60 100,0 %
<b>Žene</b>	37 46,3 %	43 53,8 %	80 100,0 %
<b>Ukupno</b>	70 50,0 %	70 50,0 %	140 100,0 %

$$\chi^2 = 1,05, df = 1, p = 0,306$$

#### 4.1.2. Utjecaj dobi, debljine, razine masnoća u krvi i navike pušenja na krvni tlak

Prije analize utjecaja pojedinih izumavljenih imbenika na krvni tlak, provjereno je razlikuju li se uzorci muškaraca i žena u raspodjeli dobi. Raspon dobi bio je u oba spola od 40 do 81 godine. Uzorci su podijeljeni u četiri dobne skupine od 10 godina i uestalosti ispitanika u svakoj od njih prikazane su u **tablici 4.1.2.1.** i na **slici 3.**  $\chi^2$ -testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u dobnoj raspodjeli muškaraca i žena ( $p=0,308$ ).

Odnosi između u krvnoga tlaka i ostalih varijabli ispitani su prvo izračunavanjem koeficijenta korelacije (**tablica 4.1.2.2.**). Značajna povezanost je utvrđena za sljedeće varijable: sistolički tlak je pokazao pozitivnu koreliranost s dobi, indeksom tjelesne mase (BMI), i koncentracijom triglicerida, dok je dijastolički tlak pokazao pozitivnu koreliranost s BMI-om i koncentracijom triglicerida, a negativnu s godinama pušenja i indeksom pušenja. Izračunavanjem koeficijenta korelacije za odvojene spolove utvrđeno je da u oba spola postoji povezanost tlakova s istim varijablama koje su istaknute u **tablici 4.1.2.2.** osim s koncentracijom triglicerida. Pokazalo se da je ona značajno povezana s krvnim tlakom samo kod muškaraca (**tablica 4.1.2.3.**).

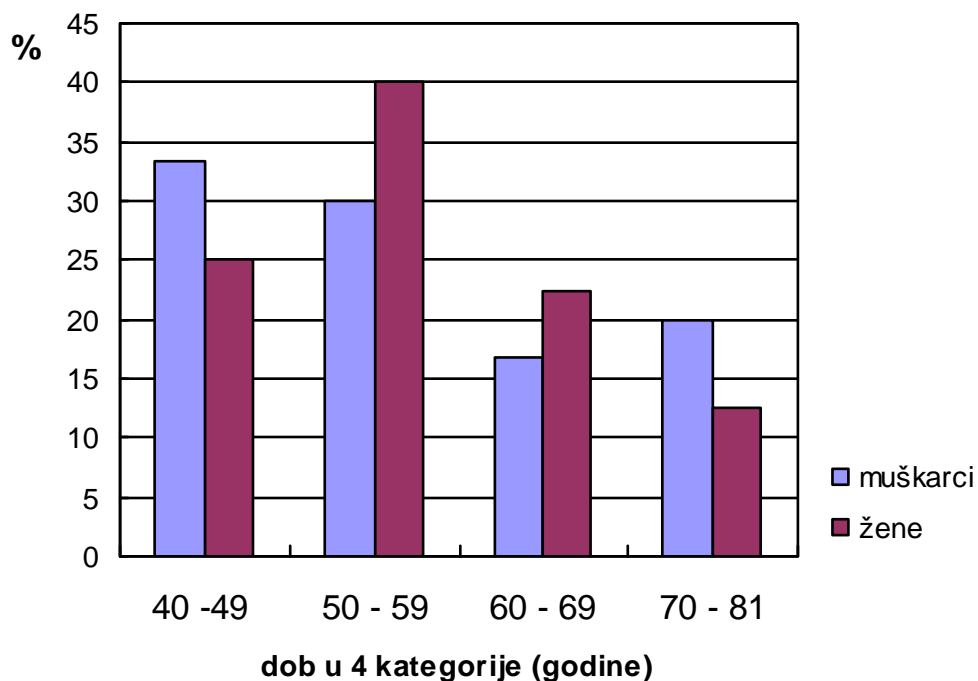
U sljedećem su koraku analize imbenici čiji je utjecaj na krvni tlak proučavan u ovom radu, uzeti kao kategorijske varijable. U **tablici 4.1.2.4.** su prikazane srednje vrijednosti i standardne devijacije sistoličkog tlaka unutar ukupnog uzorka muškaraca i žena podijeljenog u dvije dobne kategorije (40 – 59 i 60 – 81 godine), zatim u tri kategorije indeksa tjelesne mase ( $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$  – osobe normalne tjelesne mase,  $BMI 25 - 29,99 \text{ kg/m}^2$  – osobe prekomjerne tjelesne mase,  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$  – pretili), u tri tercilne kategorije koncentracije kolesterola (ispod 33,3. percentila je  $<5,99 \text{ mmol/l}$ ; 33,3. – 66,6. percentil je  $5,99 - 7,29 \text{ mmol/l}$ ; iznad 66,6. percentila je  $>7,29 \text{ mmol/l}$ ), u tri tercilne kategorije koncentracije triglicerida (ispod 33,3. percentila je  $<1,10 \text{ mmol/l}$ ; 33,3. – 66,6. percentila je  $1,10 - 1,50 \text{ mmol/l}$ ; iznad 66,6. percentila je  $>1,50 \text{ mmol/l}$ ), u tri tercilne kategorije koncentracije HDL-a (ispod 33,3. percentila je  $<0,91 \text{ mmol/l}$ ; 33,3. – 66,6. percentil je  $0,91 - 1,09 \text{ mmol/l}$ ; iznad 66,6. percentila je  $>1,09 \text{ mmol/l}$ ), zatim na pušače i nepušače i konačno u tri kategorije prema indeksu pušenja (0– nepušač, 1 – 15,  $>15$ ; vrijednost 15 je 50. percentil od onih koji puše). Razlike u sistoličkom tlaku među u navedenim kategorijama pojedine varijable testirane su analizom varijance. Isti je postupak primijenjen i za dijastolički tlak. Dobiven je statistički značajan porast sistoličkog tlaka s porastom dobi ( $p=0,030$ ), indeksa tjelesne mase ( $p=0,002$ ) i koncentracije triglicerida ( $p=0,009$ ), a dijastolički tlak s porastom indeksa tjelesne mase ( $p=0,007$ ) i koncentracije triglicerida ( $p=0,024$ ).

Ponavljanjem izra una za odvojene spolove ponovno je dobiven statistički značajan rezultat kod povezanosti sistoličkog i dijastoličkog tlaka s koncentracijom triglicerida samo kod muškaraca (tablice 4.1.2.5. i 4.1.2.6.).

**Tablica 4.1.2.1.** Dobna raspodjela uzorka po spolovima (u 4 kategorije)

	Dob u 4 kategorije				Ukupno
	40 – 49 god.	50 – 59 god.	60 – 69 god.	70 – 81 god.	
<b>Muškarci</b>	N=20 33,3 %	N=18 30,0 %	N=10 16,7 %	N=12 20,0 %	N=60 100,0 %
<b>Žene</b>	N=20 25,0 %	N=32 40,0 %	N=18 22,5 %	N=10 12,5 %	N=80 100,0 %
<b>Ukupno</b>	N=40 28,6 %	N=50 35,7 %	N=28 20,0 %	N=22 15,7 %	N=140 100,0 %

$$\chi^2 = 3,604, df = 3, p = 0,308$$



**Slika 3.** Grafički prikaz dobne raspodjele uzorka po spolovima

**Tablica 4.1.2.2.** Korelacija krvnog tlaka s dobi, BMI, koncentracijom HDL, kolesterola i triglicerida te brojem popušanih cigareta, godina pušenja i indeksom pušenja

	N= 140	
Varijable	Sistol.	Diastol.
Dob	<b>0,117</b> <b>p= 0,037</b>	- 0,122 <i>p= 0,125</i>
BMI	<b>0,336</b> <b>p&lt;0.001</b>	<b>0,256</b> <b>p= 0,002</b>
HDL	- 0,067 <i>p= 0,431</i>	- 0,032 <i>p= 0,710</i>
Kolesterol	- 0,065 <i>p= 0,448</i>	- 0,110 <i>p= 0,194</i>
Trigliceridi	<b>0,242</b> <b>p= 0,004</b>	<b>0,238</b> <b>p= 0,005</b>
Broj cigareta/dan	- 0,092 <i>p= 0,281</i>	- 0,103 <i>p= 0,225</i>
Godine pušenja	- 0,124 <i>p= 0,143</i>	<b>- 0,233</b> <b>p= 0,006</b>
Indeks pušenja	- 0,135 <i>p= 0,111</i>	<b>- 0,215</b> <b>p= 0,011</b>

**Tablica 4.1.2.3.** Korelacija krvnog tlaka s koncentracijom triglicerida kod muškaraca i žena

	muškarci N= 60		žene N= 80	
Varijable	Sistoli ki	Diastoli ki	Sistoli ki	Diastoli ki
Trigliceridi	<b>0,320</b> <b>p= 0,013</b>	<b>0,354</b> <b>p= 0,006</b>	0,159 <i>p= 0,158</i>	0,074 <i>p= 0,511</i>

**Tablica 4.1.2.4.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije sistoli og i dijastoli kog tlaka po kategorijama potencijalnih odrednica krvnoga tlaka te njihova usporedba analizom varijance (prikazana je samo zna ajnost razlika, *p*)

		Sistoli ki		Diastoli ki	
<b>Dob</b>	40 – 59 god.	137,7 ± 20,7	<b>p= 0,030</b>	88,8 ± 8,9	<i>p</i> = 0,338
	60 – 81 god.	145,5 ± 19,6		87,3 ± 9,2	
<b>BMI</b>	< 25	132,5 ± 19,8	<b>p= 0,002</b>	85,2 ± 7,1	<b>p= 0,007</b>
	25 – 29,99	139,4 ± 18,3		87,9 ± 8,6	
	≥ 30	150,6 ± 22,9		92,2 ± 10,5	
<b>HDL</b>	< 33,3 percentil	140,9 ± 19,6	<i>p</i> = 0,987	87,8 ± 9,7	<i>p</i> = 0,851
	33,3 – 66,6 percentil	140,3 ± 22,2		88,8 ± 8,7	
	> 66,6 percentil	140,2 ± 20,2		88,3 ± 8,8	
<b>Kolest.</b>	< 33,3 percentil	138,7 ± 18,4	<i>p</i> = 0,367	88,0 ± 7,6	<i>p</i> = 0,970
	33,3 – 66,6 percentil	143,9 ± 24,6		88,5 ± 10,4	
	> 66,6 percentil	138,7 ± 18,0		88,4 ± 9,1	
<b>Triglic.</b>	< 33,3 percentil	135,7 ± 18,4	<b>p= 0,009</b>	86,3 ± 8,0	<b>p= 0,024</b>
	33,3 – 66,6 percentil	138,6 ± 18,0		87,8 ± 8,3	
	> 66,6 percentil	148,3 ± 23,7		91,3 ± 10,4	
<b>Pušenje</b>	Da	138,1 ± 21,0	<i>p</i> = 0,182	86,6 ± 9,7	<i>p</i> = 0,130
	Ne	142,8 ± 20,0		89,1 ± 8,6	
<b>Indeks pušenja</b>	0 (nepuša )	142,8 ± 19,9	<i>p</i> = 0,363	89,2 ± 8,6	<i>p</i> = 0,216
	1 – 15	139,4 ± 21,4		88,7 ± 10,0	
	>15	136,9 ± 21,0		86,0 ± 8,9	

**Tablica 4.1.2.5.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije sistoli og i dijastoli kog tlaka po kategorijama koncentracije triglicerida u krvi kod muškaraca te njihova usporedba analizom varijance (prikazana je samo značajnost razlika, *p*)

Muškarci					
		Sistol.		Diastol.	
<b>Triglic.</b>	< 33,3 percentil	135,9 ± 17,3	<b>p= 0,036</b>	86,5 ± 8,3	<b>p= 0,012</b>
	33,3 – 66,6 percentil	140,0 ± 16,5		87,1 ± 9,6	
	> 66,6 percentil	150,7 ± 20,1		94,1 ± 7,9	

**Tablica 4.1.2.6.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije sistoli og i dijastoli kog tlaka po kategorijama koncentracije triglicerida u krvi kod žena te njihova usporedba analizom varijance (prikazana je samo značajnost razlika, *p*)

Žene					
		Sistol.		Diastol.	
<b>Triglic.</b>	< 33,3 percentil	135,6 ± 19,3	<i>p</i> = 0,213	86,2 ± 8,0	<i>p</i> = 0,534
	33,3 – 66,6 percentil	137,4 ± 19,4		88,4 ± 7,3	
	> 66,6 percentil	146,0 ± 21,8		88,6 ± 12,0	

## 4.2. Utjecaj ispitivanih odrednica krvnog tlaka na nastanak hipertenzije

### 4.2.1. Razlike u debljini, razini masnoća u krvi i navici pušenja između kontrolne skupine i skupine osoba s hipertenzijom

U **tablici 4.2.1.1.** prikazane su za kontrolnu i ispitivanu skupinu osoba s hipertenzijom srednje vrijednosti i standardne devijacije potencijalnih rizika i imbenika za nastanak visokog krvnog tlaka ovjeka. To su dob, indeks tjelesne mase (BMI), koncentracija HDL-a, ukupnog kolesterola, triglicerida, broj cigareta, godine pušenja i indeks pušenja. Razlike između dviju skupina testirane su analizom varijance. Statistički značajna razlika utvrđena je za BMI ( $p=0,003$ ) i koncentraciju triglicerida ( $p=0,004$ ) i vrijednosti oba obilježja više su u skupini osoba s hipertenzijom. Pokazatelji navike pušenja nisu se razlikovali između kontrolne i ispitivane skupine. Isti rezultat uestalost pušača bila je podjednaka u dvije skupine ( $p=0,866$ ) (**tablica 4.2.1.2.**).

U **tablicama 4.2.1.3. i 4.2.1.4.** uspoređene su analizom varijance vrijednosti rizika i imbenika za hipertenziju između kontrolne i ispitivane skupine odvojeno za muškarce i za žene. Kod muškaraca je utvrđena statistički značajna razlika samo za koncentraciju triglicerida ( $p=0,032$ ), dok je kod žena ta razlika na granici značajnosti ( $p=0,052$ ), a razlika u BMI-u je značajna ( $p<0,001$ ). Vrijednosti tih obilježja više su u skupini osoba s hipertenzijom.

**Tablica 4.2.1.1.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije dobi i rizi nih imbenika za hipertenziju unutar ispitivane i kontrolne skupine te njihova usporedba analizom varijance

	<b>Kontrolna skupina N= 70</b>	<b>Ispitivana skupina N= 70</b>	<b>F (df); p</b>
<b>Dob</b> (godine)	57,2 ± 10,5	57,3 ± 10,4	0,00 (1; 138); 0,987
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	26,7 ± 3,7	28,6 ± 3,9	<b>9,41 (1; 138); 0,003</b>
<b>HDL</b> (mmol/l)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,97 (1; 138); 0,326
<b>Kolesterol</b> (mmol/l)	7,4 ± 6,7	6,8 ± 1,3	0,55 (1; 138); 0,461
<b>Trigliceridi</b> (mmol/l)	1,3 ± 0,6	1,7 ± 1,1	<b>8,36 (1; 138); 0,004</b>
<b>Broj cigareta/dan</b>	10,1 ± 15,3	9,2 ± 13,1	0,14 (1; 138); 0,710
<b>Godine pušenja</b>	12,7 ± 15,9	10,5 ± 13,9	0,76 (1; 138); 0,385
<b>Indeks pušenja</b>	13,8 ± 23,6	9,9 ± 15,7	1,33 (1; 138); 0,251

**Tablica 4.2.1.2.** Uestalost puša a i nepuša a u kontrolnoj i ispitivanoj skupini

	<b>Puša</b>	<b>Nepuša</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Kontrolna skupina</b>	36 51,4 %	34 48,6 %	70 100,0 %
<b>Ispitivana skupina</b>	34 48,6 %	36 51,4 %	70 100,0 %
<b>Ukupno</b>	70 50,0 %	70 50,0 %	140 100,0 %

$$\chi^2 = 0,11, df = 1, p = 0,735$$



**Tablica 4.2.1.3.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije dobi i rizi nih imbenika za hipertenziju unutar ispitivane i kontrolne skupine kod muškaraca te njihova usporedba analizom varijance

	<b>Muškarci</b>		
<b>Varijable</b>	<b>Kontrolna skupina N= 30</b>	<b>Ispitivana skupina N= 30</b>	<b>F (df); p</b>
<b>Dob</b> (godine)	56,8 ± 11,7	56,8 ± 11,6	0,00 (1; 58); 0,991
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	28,1 ± 4,1	27,8 ± 3,4	0,08 (1; 58); 0,777
<b>HDL</b> (mmol/l)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,67 (1; 58); 0,201
<b>Kolesterol</b> (mmol/l)	6,6 ± 1,2	6,8 ± 1,6	0,53 (1; 138); 0,470
<b>Trigliceridi</b> (mmol/l)	1,4 ± 0,6	2,0 ± 1,4	<b>4,82 (1; 138); 0,032</b>

**Tablica 4.2.1.4.** Srednje vrijednosti te standardne devijacije dobi i rizi nih imbenika za hipertenziju unutar ispitivane i kontrolne skupine kod žena te njihova usporedba analizom varijance

	<b>Žene</b>		
<b>Varijable</b>	<b>Kontrolna skupina N= 40</b>	<b>Ispitivana skupina N= 40</b>	<b>F (df); p</b>
<b>Dob</b> (godine)	56,8 ± 9,6	56,8 ± 9,5	0,00 (1; 78); 0,991
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	25,6 ± 2,9	29,3 ± 4,2	<b>20,25 (1; 78); &lt;0,001</b>
<b>HDL</b> (mmol/l)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,00 (1; 78); 0,963
<b>Kolesterol</b> (mmol/l)	8,0 ± 8,8	6,7 ± 1,1	0,81 (1; 78); 0,372
<b>Trigliceridi</b> (mmol/l)	1,2 ± 0,6	1,5 ± 0,7	<b>3,91 (1; 78); 0,052</b>

#### 4.2.2. Razlike u razdiobi alela i genotipova ACE I/D polimorfizma izme u kontrolne skupine i skupine osoba s hipertenzijom

U **tablici 4.2.2.1.** je prikazana razdioba genotipova *ACE I/D* polimorfizma, odnosno broj osoba koje nose odre eni genotip polimorfizma u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. Iz genotipskih podataka prebrojeni su aleli polimorfizma. Budu i da svaka osoba posjeduje dva alela na pojedinom lokusu, ukupan broj alela polimorfizma jednak je  $2N$ . Broj i udio alela polimorfizma prikazan je u **tablici 4.2.2.2.**

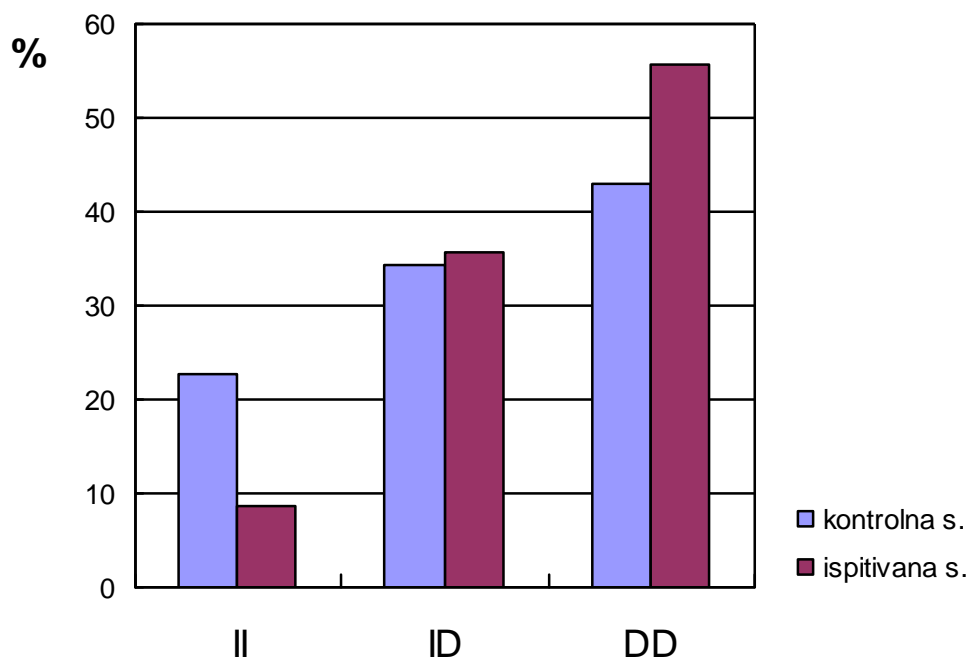
S ciljem da se ispita razlika izme u kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na izu avani *ACE I/D* polimorfizam, uspore ena je razdioba genotipova u dvije skupina. Razlika izme u njih testirana je  $\chi^2$ -testom (**tablica 4.2.2.1.**) i ona je na granici zna ajnosti ( $p=0,057$ ). U ispitivanoj je skupini zastupljeniji homozigotni genotip *DD*, što je vidljivo i na grafi kom prikazu razdiobe genotipova na **slici 4.**  $\chi^2$ -testom testirana je i razlika u u estalosti alela *I* i *D* izme u iste dvije skupine (**tablica 4.2.2.2.**) te je dobivena statisti ki zna ajna razlika ( $p=0,016$ ). Alel *D* u estaliji je u ispitivanoj skupini (73,6%), a alel *I* u kontrolnoj skupini (40,0%).

**Tablica 4.2.2.1.** Razdioba genotipova polimorfizma *ACE I/D* u kontrolnoj i ispitivanoj skupini i zna ajnost njihove razlike testirana  $\chi^2$ -testom s 2 stupnja slobode (navedena je u estalost svakog genotipa u apsolutnom broju i udio u postocima)

	<b>II</b>	<b>ID</b>	<b>DD</b>	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>Kontrolna skupina</b>	16 22,9 %	24 34,3 %	30 42,9 %	5,740	0,057
<b>Ispitivana skupina</b>	6 8,6 %	25 35,7 %	39 55,7 %		

**Tablica 4.2.2.2.** Razdioba alela *ACE I/D* polimorfizma u kontrolnoj i ispitivanoj skupini i značajnost njihove razlike testirana  $\chi^2$ -testom s 1 stupnjem slobode (navedena je u postotnost svakog alela u apsolutnom broju i udio u postocima)

	<b>I</b>	<b>D</b>	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>Kontrolna skupina</b>	56 40,0 %	84 60,0 %	<b>5,812</b>	<b>0,016</b>
<b>Ispitivana skupina</b>	37 26,4 %	103 73,6 %		



**Slika 4.** Grafički prikaz razdiobe genotipova polimorfizma *ACE I/D* u kontrolnoj i ispitivanoj skupini

#### 4.2.3. Me udjelovanje ispitanih odrednica na nastanak hipertenzije

Kako bi se ispitao utjecaj *ACE I/D* polimorfizma na nastanak hipertenzije provedena je univarijatna logisti ka regresija (**tablica 4.2.3.1.**). Homozigotni genotip manje u estalog alela (*II* genotip) uzet je kao referentni genotip u odnosu na koji su uspore eni heterozigotni i homozigotni genotipovi u estalijeg alela, jer se iz dosad objavljene literature može zaklju iti da *D* alel, dakle u estaliji alel, nosi eventualni rizik za pojavu hipertenzije. Takav zaklju ak sugeriraju i rezultati iz prethodnog poglavlja ovoga rada (poglavlje 4.2.2., **tablica 4.2.2.1.** i **4.2.2.2.**). Vjerojatnost za nastanak hipertenzije se pove ava ukoliko je osoba homozigot za alel koji nosi rizik u odnosu na genotip koji je uzet kao referentni. Omjer šanse (*odds ratio*, OR) u **tablici 4.2.3.1.** pokazuje da *DD* genotip pove ava vjerojatnost 3,47 puta (s 95% intervalom pouzdanosti izme u 1,21 i 9,93) za nastanak hipertenzije u odnosu na referentni *II* genotip. Omjer šanse za *ID* genotip je na razini zna ajnosti 7% ( $p=0,067$ ), zbog ega je još ispitana i vjerojatnost za nastanak hipertenzije s obzirom na združene genotipove *DD* i *ID*. U **tablici 4.2.3.2.** prikazan je rezultat logisti ke regresije kada su *DD* i *ID* genotipovi zajedno uspore eni s *II* genotipom gdje možemo vidjeti da je dobiven omjer šanse 3,16 (s 95% intervalom pouzdanosti 0,93 – 8,28). Dobiveni omjer šanse pokazao se zna ajnim ( $p=0,025$ ), ali je niži nego onaj za *DD* genotip zasebno što upu uje na to da *D* alel nosi rizik, ali primarno u homozigotnom obliku. To govori u prilog mišljenju da je rije o recesivnom utjecaju *D* alela na nastanak povišenog krvnoga tlaka.

S ciljem da se ispita potencijalni utjecaj poznatih rizi nih imbenika za hipertenziju u izu avanom uzorku provedena je multivarijatna logisti ka regresija u kojoj su, osim *ACE I/D* polimorfizma, kao varijable uvrštene spol, dob, BMI, koncentracije kolesterola, HDL-a i triglicerida te indeks pušenja (**tablica 4.2.3.3.**). Na eno je da statisti ki zna ajan utjecaj na nastanak hipertenzije u ukupnom uzorku imaju BMI, koncentracija triglicerida i *ACE I/D* polimorfizam. Dobiveni omjer šanse za BMI je 1,14 (95% interval pouzdanosti izme u 1,03 i 1,27), a za koncentraciju triglicerida 2,03 (95% interval pouzdanosti izme u 1,11 i 3,70). Utjecaj *ACE I/D* polimorfizma je uz uklju ivanje prije navedenih rizi nih imbenika neznatno porastao, s omjerom šanse od 4,12 (95% interval pouzdanosti izme u 1,31 i 12,99).

**Tablica 4.2.3.1.** Omjer šanse (*odds ratio*, OR) s 95% intervalom pouzdanosti (*confidence interval*, CI) za pojavu hipertenzije za polimorfizam *ACE I/D* koji se nalazi unutar gena RAS sustava izra unat univarijatnom logisti kom regresijom

		OR	95% CI	p
<i>ACE ID</i>	<i>ID versus II</i>	2,78	0,93 – 8,28	0,067
	<i>DD versus II</i>	<b>3,47</b>	<b>1,21 – 9,93</b>	<b>0,021</b>

**Tablica 4.2.3.2.** Omjer šanse (*odds ratio*, OR) s 95% intervalom pouzdanosti (*confidence interval*, CI) za pojavu hipertenzije s obzirom na posjedovanje zajedno heterozigotnog i homozigotnog genotipa rizi nog alela u odnosu na drugi homozigotni genotip za polimorfizam *ACE I/D* izra unat univarijatnom logisti kom regresijom

		OR	95% CI	p
<i>ACE ID</i>	<i>DD + ID versus II</i>	<b>3,16</b>	<b>1,16 – 8,64</b>	<b>0,025</b>

**Tablica 4.2.3.3.** Omjer šanse (*odds ratio*, OR) s 95% intervalom pouzdanosti (*confidence interval*, CI) za pojavu hipertenzije za *ACE I/D* polimorfizam i sedam rizi nih faktora za hipertenziju izra unati multivarijatnom logisti kom regresijom

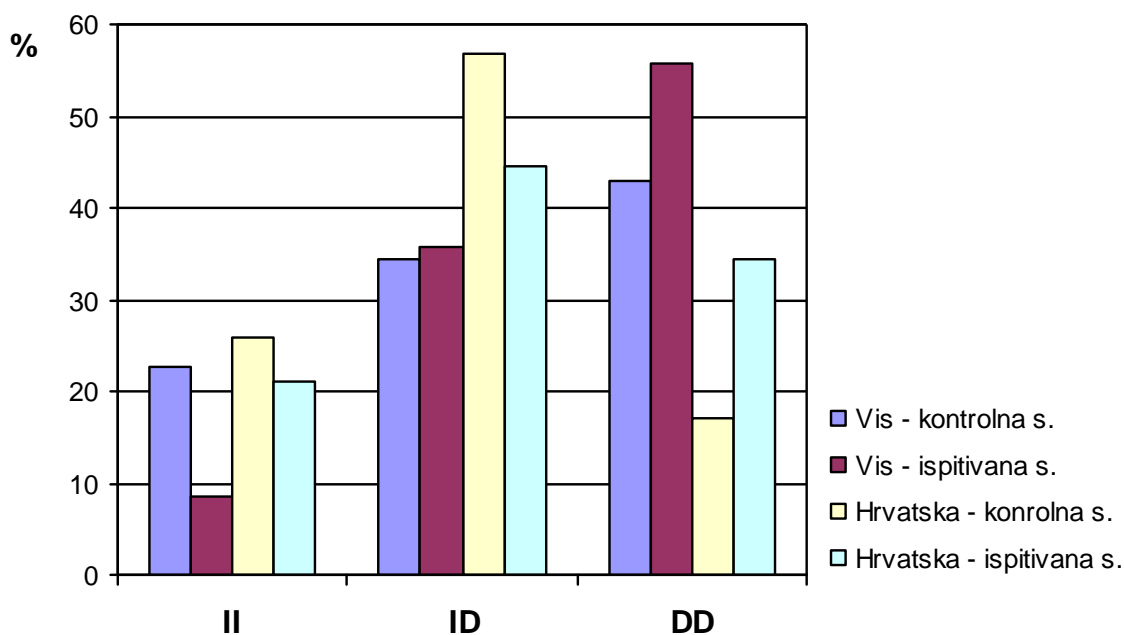
		OR	95% CI	p
<i>ACE ID</i>	<i>DD + ID versus II</i>	<b>4,12</b>	<b>1,31 – 12,99</b>	<b>0,016</b>
Spol	Žene <i>versus</i> Muškarci	1,41	0,66 – 3,00	0,372
Dob (godine)		0,99	0,95 – 1,02	0,471
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		<b>1,14</b>	<b>1,03 – 1,27</b>	<b>0,016</b>
Kolesterol (mmol/l)		0,96	0,83 – 1,11	0,537
HDL (mmol/l)		1,55	0,11 – 21,10	0,743
Trigliceridi (mmol/l)		<b>2,03</b>	<b>1,11 – 3,70</b>	<b>0,022</b>
Indeks pušenja		0,99	0,97 – 1,01	0,477

#### 4.3. Usporedba utjecaja ACE I/D polimorfizma na nastanak hipertenzije u populaciji

##### Visa i opoj populaciji Hrvatske

Kao sljedeći korak u radu uspoređen je utjecaj ACE I/D polimorfizma na nastanak hipertenzije u izoliranoj populaciji otoka Visa i opoj populaciji Hrvatske. U tu su svrhu iz rada Barbali i sur. (2005) iskorišteni podaci za op u populaciju Hrvatske u kojoj je hipertenzija bila definirana na isti način kao što je to učinjeno u ovome radu za populaciju otoka Visa. Razdioba genotipova u kontrolnoj i ispitivanoj skupini svake populacije prikazane su usporedno u **tablici 4.3.1**. Vidljivo je da u viškoj populaciji postoji znatno manja učestalost heterozigota ID i znatno veća učestalost homozigotnih DD genotipova nego u populaciji Hrvatske. Grafički prikaz razdiobe genotipova ACE I/D polimorfizma u kontrolnoj i ispitivanoj skupini u obje populacije može se vidjeti na **slici 5**.

Veza između ACE I/D polimorfizma i hipertenzije na otoku Visa je i u populaciji Visa i u populaciji Hrvatske. Značajan omjer vjerojatnosti za nastanak hipertenzije u obje je populacije vezan samo uz DD genotip. Veći je u populaciji otoka Visa gdje iznosi 3,47 nego u populaciji Hrvatske gdje je on 2,50, što potvrđuje pogodnost ove izolirane populacije za istraživanja genetičke podloge hipertenzije kao kompleksnog poremećaja.



**Slika 5.** Grafički prikaz razdiobe genotipova polimorfizma ACE I/D u kontrolnoj i ispitivanoj skupini u dvije populacije

**Tablica 4.3.1.** Razdioba genotipova i omjer vjerojatnosti za hipertenziju (OR) u populaciji  
 Visa i populaciji Hrvatske (statistički značajni OR istaknuti su podebljano)

VIS	II	ID	DD	Ukupno	<sup>2</sup>	p
Kontrolna skupina	16 22,9 %	24 34,2 %	30 42,9 %	70 100,0 %	5,740 (df=2)	0,057
Ispitivana skupina	6 8,6 %	25 35,7 %	39 55,7 %	70 100,0 %		
OR (95% CI)	ID	2,78 (0,93 – 8,28)				
II je referentan	DD	3,47 (1,21 – 9,93)				

HRVATSKA	II	ID	DD	Ukupno	<sup>2</sup>	p
Kontrolna skupina	32 26,0 %	70 56,9 %	21 17,1 %	123 100,0 %	9,590 (df=2)	0,080
Ispitivana skupina	25 21,0 %	53 44,5 %	41 34,5 %	119 100,0 %		
OR (95% CI)	ID	0,97 (0,51 – 1,83)				
II je referentan	DD	2,50 (1,19 – 2,84)				

## 5. RASPRAVA

Hipertenzija je kompleksni poremećaj pod zajedničkim utjecajem genetičkih i okolišnih imbenika, te predstavlja jedan od najvažnijih rizika imbenika za nastanak kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti. Cilj genetičkih studija kompleksnih bolesti je nalaženje varijanti u genomu koje doprinose razvoju bolesti. Kako kompleksna obilježja ne definira samo jedna genetička varijanta niti mali broj njih, tako je s nastankom hipertenzije do sada povezan velik broj različitih gena koji djeluju zajedno te međusobno djeluju s različitim okolišnim imbenicima.

Smatra se da za nastanak esencijalne hipertenzije, dakle hipertenzije koja nije nastala kao posljedica neke druge bolesti, može biti odgovorno nekoliko patofizioloških procesa kao što su povećana simpatička aktivnost, abnormalnosti ravnoteže soli i poremećaji u transportu  $\text{Ca}^{2+}$  (Lund – Johansen 2002). Pri tome se ne mogu znati nepravilnosti kojeg od procesa utječu na nastanak hipertenzije. Regulaciju izlučivanja soli kontroliraju mnogi mehanizmi od kojih je jedan reninsko-angiotenzinski sustav.

U ovoj studiji se pokušalo otkriti međusobno djelovanje različitih rizika imbenika od kojih se za neke zna, a za neke pretpostavlja da utječu na regulaciju krvnog tlaka, odnosno na nastanak hipertenzije. To su spol, dob, debljina, razina masnoća u krvi i navika pušenja. Od kandidatskih gena za nastanak hipertenzije proučavan je ACE-gen koji spada u najintenzivnije proučavane kandidatske gene u ljudskoj kardiovaskularnoj patofiziologiji. ACE-gen kodira enzim koji čini jednu od osnovnih odrednica reninsko-angiotenzinskog sustava čiji je utjecaj na regulaciju krvnog tlaka dobro poznat i time predstavlja dobar izbor za ovo istraživanje.

Premda je ogroman broj molekularno-genetičkih studija napravljen s ciljem otkrivanja gena koji doprinose povišenju krvnog tlaka i nastanku hipertenzije, niti za jedan gen zasada se ne može sa sigurnošću reći da zaista utječe na pojavu kompleksnog oblika hipertenzije. Ukoliko postoji jedan glavni lokus (*major locus*) odgovoran za nastanak hipertenzije, neparametrijske analize vezanosti gena, tj. metode alelnog dijeljenja (*allele-sharing method*), trebale bi biti uspješne u razotkrivanju tog lokusa. Međutim, ukoliko je broj gena velik i njihov učinak slab (što je vjerojatniji model), uzorak koji bi bio potreban za analizu vezanosti gena je ogroman i u tom slučaju asocijacijske studije pogodnije (Jones 1998). O velikom broju gena s malim učinkom govore rezultati studije npr. Rudan i sur. (2003b) koji su, istražujući genetičku pozadinu hipertenzije, procijenili postojanje 300 do 600 lokusa koji bi mogli imati utjecaj na krvni tlak.



Svrha asocijacijskih studija je testirati povezanost ispitanog fenotipa s polimorfizmima izabranog kandidatskog gena. Ograničenje tih studija predstavlja to što moramo znati funkciju, lokalizaciju i polimorfizme gena i što one ne mogu odrediti ulogu gena za koje još nije prepoznata funkcija u patofiziološkom mehanizmu razvoja određene bolesti. Krajnji cilj je među odabranim polimorfizmima kandidatskih gena naći i mutaciju koja ima funkcionalni učinak, tj. koja modificira kvalitativno ili kvantitativno genski produkt. Ostali polimorfizmi koji nemaju funkcionalni učinak mogu biti statistički povezani s istraživanim fenotipom pod uvjetom da između takvog polimorfizma (tzv. biljega) i funkcionalnog polimorfizma postoji neravnoteža vezanosti gena (LD). Dakle, povezanost između avanog polimorfizma i fenotipa funkcija je dvaju parametara: jačina efekta koji funkcionalna mutacija ima na fenotip i veličina LD-a između te mutacije i avanog polimorfizma (biljega) (Tahri – Daizadeh 2003). Pretpostavlja se da je u ovoj studiji između avanog *ACE I/D* polimorfizma i biljega pokazuje efekt nekog drugog, još nepoznatog funkcionalnog polimorfizma *ACE*-gena. To potvrđuje i činjenica da se *ACE I/D* polimorfizam nalazi u području introna, odnosno nekodirajućoj sekvenci DNA.

Iako je ustanovljena povezanost *D* alela *ACE I/D* polimorfizma s povišenom koncentracijom ACE-a u plazmi, nije potvrđen utjecaj povišene koncentracije ACE-a na povećano stvaranje angiotenzina II, tj. nastanak hipertenzije, jer su u različitim studijama dobiveni kontradiktorni rezultati (npr. Muller i sur. 1998, Danser i sur. 1999, Muller i sur. 1997). Hollenberg i sur. (1998) pokazali su da više od 40% angiotenzina I može biti pretvoreno u angiotenzin II čak neovisno o ACE-u. Međutim, ACE može utjecati na regulaciju krvnog tlaka i neovisno o proteolitičkoj kaskadi koja vodi k stvaranju angiotenzina II, s obzirom na to da inhibira bradikinin koji je odgovoran za vazodilataciju i sprečava rast glatkih mišićnih stanica u endotelnim stjenkama. Koncentracija bradikinina smanjena je u hipertenziji (Levy i sur. 1977, Gainer i sur. 1996). Brown i sur. (1998) utvrdili su povezanost *D* alela *ACE ID* polimorfizma s povećanom degradacijom bradikinina. Činjenica koja govori u prilog važnoj ulozi ACE-a u nastanku hipertenzije je efikasnost ACE-inhibitora u liječenju esencijalne hipertenzije (Hansson i sur. 1993).

U ovoj studiji *ACE I/D* polimorfizam pokazao se značajnim prediktorom razine krvnog tlaka što je u suglasnosti samo sa jednim dijelom znanstvene literature. Naime, u velikom se broju studija može naći i potvrda da *ACE I/D* polimorfizam zaista ima utjecaj na krvni tlak i nastanak hipertenzije (npr. Barley i sur. 1996, Duru i sur. 1994, Morise i sur. 1994, O'Donnell i sur. 1998). Međutim, s druge strane, postoji i niz studija u kojima se pokazalo da ovaj polimorfizam nema nikakav značajan učinak na nastanak hipertenzije (npr.

Jeunemaitre i sur. 1992, Vassilikioti i sur. 1996, Schmidt i sur. 1993, Higashimori i sur. 1993, Harrap i sur. 1993, Kiema i sur. 1996, Jelakovi i sur. 2002). Mogu i razlozi za ovakvu nesuglasnost u literaturi bi mogli biti sljedeći: populacijska stratifikacija – različite populacije imaju različiti genetički sastav, odnosno različite učestalosti alela na pojedinim lokusima; velika uzorka – malim uzorcima nedostaje statistička moć potrebna da se detektiraju male statističke razlike (Jeunemaitre i sur. 1997); različito definiranje hipertenzije, odnosno kontrolne i ispitivane skupine (Tiret i sur. 1998).

Postoje tri osnovna i najčešća modela koja objašnjavaju način na koji alel koji nosi rizik može utjecati na određeni fenotip. To su dominantni, kodominantni i recesivni model nasljeđivanja. U prvom slučaju, kada je nasljeđivanje dominantno, rizikni alel utječe na fenotip podjednako u homozigotnoj i heterozigotnoj formi. U drugom slučaju rizikni alel utječe na fenotip već u heterozigotnoj formi u odnosu na homozigotni genotip neriziknog alela, a jačina se utjecaja udvostručuje kod homozigota riziknog alela. U trećem, recesivnom modelu, homozigotna forma riziknog alela utječe na fenotip. Upravo se ovaj posljednji model može primijeniti na rezultate analize *ACE I/D* polimorfizma u našem uzorku. Naime, šansa za nastanak hipertenzije povećava se 3,47 puta ukoliko je osoba *DD* homozigot, tj. nosi dva *D* alela na *ACE I/D* lokusu u odnosu na osobu koja posjeduje dva *I* alela na istom lokusu. Budući da je dobiven omjer šanse za *ID* genotip na razini značajnosti 6% ( $p=0,062$ ), ispitana je i vjerojatnost za nastanak hipertenzije s obzirom na združene genotipove *DD* i *ID*. Dobiveni omjer šanse ( $OR=3,16$ ) pokazao se takođe značajnim ( $p=0,025$ ), ali je niži nego onaj za *DD* genotip zasebno što potvrđuje to da *D* alel nosi rizik, ali primarno u homozigotnom obliku. Nalaz koji upućuje na recesivni efekt *D* alela na povišeni krvni tlak dobiven je ranije u istraživanju opće populacije Hrvatske (Barbali 2004, Barbali i sur. 2006). Time rezultat ovoga rada kao i nalaz u populaciji Hrvatske govore u prilog utjecaju *DD* genotipa *ACE I/D* polimorfizma na krvni tlak i nastanak hipertenzije u ovjeka.

Izolirane populacije se smatraju izrazito pogodnima za istraživanja genetičke podloge kompleksnih obilježja iz različitih razloga (Varilo i sur. 2003). Niska razina pritoka novih gena olakšava proučavanje drugih evolucijskih sila kao što su genetički pomak (*drift*) i prirodna selekcija. Visok stupanj srođivanja (*inbreeding*) smanjuje heterozigotnost (Rudan i sur. 2003) i rezultira povećanjem LD-blokova duž genoma, odnosno dijelova genoma karakteriziranih visokim LD-om koji se kao takvi nasljeđuju zajedno (Wright i sur. 1999). U izoliranim populacijama Hrvatske je iz geografskih i socio-kulturoloških razloga povećan koeficijent srođivanja na razini pojedinca i cijele populacije (Rudan i sur. 1999). U ovom istraživanju se populacija otoka Visa pokazala pogodnom za istraživanja genetičke podloge

hipertenzije kao kompleksnog poremećaja, što potvrđuju i brojni radovi (npr. Škarić-Jurić i Smolej Naranj 2003, Škarić-Jurić i sur. 2005). Naime, izražena unata prevalencija razvijene hipertenzije (sistolički tlak  $\geq 160$  mmHg i/ili dijastolički tlak  $\geq 95$  mmHg) na Visu je čak 40,4%. Kompleksne segregacijske analize potvrdile su hipotezu *major* gena (*major gene hypothesis*) u populaciji otoka Visa, tj. postojanje *major* gena koji objašnjava 42% varijacije sistoličkog odnosno 47,6% dijastoličkog krvnog tlaka (Škarić-Jurić i sur. 2003, 2005).

Osim polimorfizma *ACE I/D*, u ovome su radu proučavani još i spol i dob kao nepromjenjivi čimbenici koji utječu na krvni tlak čovjeka, a uz njih razmatrani su promjenjivi, u širem smislu okolišni, čimbenici: debljina, razina masnoća u krvi i navika pušenja. Dob se u odrasloj populaciji otoka Visa pokazala značajnom odrednicom sistoličkog tlaka. S porastom dobi sistolički tlak raste tako da mu je prosječna vrijednost u dobi od 40-59 godina 138 mmHg, a u dobi od 60 i više godina 146 mmHg. Porast sistoličkog tlaka s dobi uobičajen je nalaz i već je utvrđen u otocnim populacijama Srednje Dalmacije (Škarić-Jurić i Smolej Naranj 2003, Škarić-Jurić i sur. 2005, Barbalić i sur. 2006).

Zanimljivo je da su godine pušenja i indeks pušenja negativno korelirale s dijastoličkim tlakom. Pušenje se dakle pokazalo značajnim na sniženje dijastoličkog krvnog tlaka, što je u suglasnosti s nekim drugim studijama (npr. Fogarić i sur. 1996).

Već kod usporedbe između spolova zabilježena je viša razina triglicerida u krvi kod muškaraca, pa se upravo za koncentraciju triglicerida pokazalo da značajno utječe na nastanak hipertenzije kod muškaraca ( $p=0,032$ ). Nezanemariv je i podatak da se kod žena pokazala tendencija ka statistički značajnim razlikama za koncentraciju triglicerida između kontrolne i ispitivane skupine s hipertenzijom ( $p=0,052$ ). U ovoj studiji je potvrđeno da su trigliceridi rizičan čimbenik za hipertenziju, dok, za razliku od nalaza u drugim populacijama (npr. Halperin i sur. 2006, Borghi i sur. 2004), ukupni kolesterol i HDL kolesterol u populaciji Visa nisu imali utjecaja na povišen krvni tlak.

U literaturi je zabilježeno da debljina koja je najčešće ispitivana koriste i indeks tjelesne mase (BMI), ima utjecaj na krvni tlak ovisno o populaciji u kojoj je ta veza ispitivana (Mufunda i sur. 2006, Mufunda i sur. 2007). U ovoj studiji BMI je pokazao značajan utjecaj na krvni tlak samo kod žena ( $p<0,001$ ). Gledajući prosječan BMI od  $27,5 \text{ kg/m}^2$ , žene se nisu razlikovale od muškaraca, ali su hipertenzivne žene bile sklonije prekomjernoj težini od onih s normalnim krvnim tlakom. Za razliku od višestruke populacije, u nekim je drugim studijama zabilježen već i utjecaj BMI na krvni tlak kod muškaraca (Mufunda i sur. 2006). Razlog suprotnim nalazima u različitim studijama mogli bi biti različiti pragovi BMI kod kojih se pojavljuje veza između BMI i krvnog tlaka ovisno o populaciji (Mufunda 2007).

Po pitanju razlike između spolova zanimljivi su rezultati istraživanja povezanosti endogamije, odnosno sroćavanja (*inbreeding-a*) s varijacijama krvnog tlaka u hrvatskim otocnim izolatima (Smolej Naranj i Rudan 2001, Rudan i sur. 2003b). Za razinu endogamije, koja indirektno govori i o stupnju sroćavanja određene populacije, pokazalo se da ona korelira s krvnim tlakom kod muškaraca što upućuje na značajniji genetički utjecaj na krvni tlak kod muškaraca. U velikoj populacijskoj studiji u kojoj je bilo uključeno više od 2000 obitelji s 2 – 25 članova (*Framingham Heart Study*), rezultati su pokazali da je ACE-lokus spolno specifičan kandidatski lokus za hipertenziju, tj. da je njegov učinak specifičan za muškarce (O'Donnell i sur. 1998). Uzorak u ovoj studiji nije bio toliko velik da omogući direktnu provjeru navedenog nalaza dobivenog u američkoj populaciji. Međutim, multivarijatna analiza u kojoj je istovremeno proučavan utjecaj *ACE I/D* polimorfizma i spola na pojavu hipertenzije nije upućivala na značajan učinak spola, dok je utjecaj polimorfizma bio značajan i jasno pokazao vezu između *DD* genotipa i povišenog krvnog tlaka u proučavanoj populaciji otoka Visa.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju se nastojalo utvrditi me udjelovanje genetičkih i okolišnih imbenika na nastanak hipertenzije u populacijskom izolatu otoka Visa. Podaci koji su obuhvaćeni u ovome radu prikupljeni su u odraslom stanovništvu u dobi od 40 do 81 godine. Nastojalo se utvrditi utječe li *ACE I/D* polimorfizam kao primjer genetičkog imbenika koji se nalazi unutar jednog od gena odgovornog za regulaciju krvnog tlaka, na krvni tlak uvijek, s naglaskom na nastanak hipertenzije. Preostali nepromjenjivi imbenici izučavani u ovom radu su spol i dob, a uz njih izučavani su promjenjivi, u širem smislu okolišni, imbenici: debljina, razina masnoća u krvi i navika pušenja. Došlo se do sljedećih zaključaka:

- Ustanovljena je pozitivna korelacija sistoličkog tlaka s dobi, BMI-om i koncentracijom triglicerida, te pozitivna korelacija dijastoličkog tlaka s BMI-om i koncentracijom triglicerida, a negativna s brojem godina pušenja i indeksom pušenja.
- Kod muškaraca je značajan utjecaj na povišenje krvnog tlaka imala koncentracija triglicerida, a kod žena je to bio BMI.
- *ACE I/D* polimorfizam je pokazao povezanost s pojavom hipertenzije s omjerom šanse od 3,47 za nastanak hipertenzije. Povezanost se očituje kao tzv. recesivni model, tj. jedino kod osoba koje su homozigoti za „rizični“ *D* alel polimorfizma šansa za nastanak hipertenzije se povećava. S obzirom da ovaj polimorfizam nije u kodirajućoj regiji gena, pretpostavlja se da pokazuje utjecaj trećeg, funkcionalnog alela koji je u neravnoteži vezanosti gena s izučavanjem.
- Usporedbom rizičnih imbenika za hipertenziju - spola, dobi, BMI-a, koncentracije kolesterola, HDL-a i triglicerida te indeksa pušenja – između kontrolne i ispitivane skupine, pokazalo se da se ove dvije skupine razlikuju s obzirom na BMI i koncentraciju triglicerida koje su više u skupini osoba s hipertenzijom.
- Utjecaj *ACE I/D* polimorfizma je uz uključivanje prije navedenih rizičnih imbenika ostao značajan čak nešto većim omjerom šanse za hipertenziju od 4,12 što pokazuje da je neovisan o njima.
- U međupopulacijskoj usporedbi između opće populacije Republike Hrvatske i populacije otoka Visa ustanovljena je smanjena heterozigotnost, velika prevalencija *ACE DD* genotipa i naposljetku jača veza između *DD* genotipa i povišenog krvnog tlaka na otoku Visu. To potvrđuje pogodnost ove izolirane populacije za istraživanja genetičke podloge hipertenzije kao kompleksnog poremećaja.

## 7. LITERATURA

- Bara L, Perić M, Klarić IM, Janjavić B, Parik J, Rootsi S, Rudan P (2003) Y chromosome STRs in Croatians. *Forensic Sci Int* 138(1-3): 127-33.
- Barchiesi F, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Fingerle J, Dubey RK (2002) Methoxyestradiols mediate estradiol-induced antimitogenesis in human aortic SMCs. *Hypertension*. 39: 874–879.
- Barbalić M (2004) Polimorfizmi kandidat-gena unutar renin-angiotenzin sustava i hipertenzija u stanovništvu Hrvatske. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Barbalić M, Škarić-Jurić T, Cambien F, Barbaux S, Poirier O, Turek S, Vrhovski-Hebrang D, Čubrilo-Turek M, Rudan I, Rudan P, Smolej Narančić N (2006) Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system and early development of hypertension. *American Journal of Hypertension*. 19 (8); 837-842.
- Barbalić M., T. Škarić-Jurić, N. Smolej Narančić, I. Rudan, S. Turek, P. Rudan (2005) Association of ACE I/D polymorphism with hypertension in Croatia and its isolate. European Human genetics Conference 2005 of the European Society of Human Genetics, Prague. *European Journal of Human Genetics*, 13 (Suppl 1): 330, 2005
- Barbalić M (2007) Polimorfizmi kandidatskih gena za hipertenziju u izoliranoj populaciji – primjer stanovništva otoka Visa. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Barley J, Blackwood A, Miller M, Markandu ND, Carter ND, Jeffery S, Cappuccio FP, MacGregor GA, Sagnella GA (1996): Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J Hypertens* 10: 31–35.
- Borghesi C, Dormi A, Veronesi M, Sangiorgi Z, Gaddi A (2004) Association between different lipid-lowering treatment strategies and blood pressure control in the Brisighella Heart Study. *Am Heart J*. 148: 285–292.
- Brown NJ, Blais C Jr, Gandhi SK, Adam A (1998): ACE insertion/deletion genotype affects bradykinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 373-7.
- Bunker CH, Ukoli FA, Matthews KA, Kriska AM, Huston SL, Kuller LH (1995) Weight Threshold and Blood Pressure in a Lean Black Population. *Hypertension* 26:616-623
- Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C (1988) Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet* 43: 774-780.

Campbell H, Carothers AD, Rudan I, Hayward C, Biloglav Z, Bara L, Pericic M, Jani ijevi B, Smolej Naran i N, Polašek O, Kol i I, Weber JL, Hastie ND, Rudan P, Wright AF (2007) Effects of genome-wide heterozygosity on a range of biomedically relevant human quantitative traits. *Human Molecular Genetics* 16(2):233-241.

Cardon LR, Abecasis GR (2003): Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 19: 135-40.

Carey RM, Siragy HM (2003) Newly recognized components of renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24: 261-271.

Carretero AO, Oparil S (2000) Essential Hypertension Part I: Definition and Etiology. *Circulation* 101: 329-335.

Crews JK, Khalil RA (1999) Gender-specific inhibition of  $Ca^{2+}$  entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 26:707–715.

Danser AH, Deinum J, Osterop AP, Admiraal PJ, Schalekamp MA Angiotensin I to angiotensin II conversion in the human forearm and leg (1999): Effect of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *J Hypertens* 17: 1867-72.

Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK, Keller PJ (1999) Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension*. 33 :177–182.

Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, Jackson EK (2004) Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here? *Hypertension*. 44:789 –795.

Duru K, Farrow S, Wang JM, Lockette W, Kurtz T (1994): Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African Americans with hypertension. *Am J Hypertens* 7 : 759-62.

Egan BM (2003) Insulin resistance and the sympathetic nervous system. *Curr Hypertens Rep*. 5: 247–254.

Fogari R, Zoppi A, Lusardi P, Marasi G, Villa G, Vanasia A (1996) Cigarette smoking and blood pressure in a worker population: a cross-sectional study. *J Cardiovasc Risk*; 3:55–9.

Gainer JV, Nadeau JH, Ryder D, Brown NJ (1996): Increased sensitivity to bradykinin among African Americans. *J Allergy Clin Immunol* 98: 283-7.

Goldstein DB, Weale ME (2001): Linkage disequilibrium holds the key. *Curr Biol* 11: R576–R579.

Gordon MS, Chin WW, Shupnik MA (1992) Regulation of angiotensin gene expression by estrogen. *J Hypertens* 10 (4): 361-6.

- Green MS, Jucha E, Luz Y (1986) Blood pressure in smokers and nonsmokers: epidemiologic findings. *Am Heart J* 111:932–40.
- Grell GA (1983) Hypertension in the West Indies. *Postgrad Med J* 59 (696): 616-21.
- Guyton AC, Hall JE (2006) Medicinska fiziologija, 11. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
- Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP (1996) Metabolic precursors of hypertension: the San Antonio Heart Study. *Arch Intern Med.* 156: 1994–2000.
- Halperin, RO, Sesso, HD, Ma, J, Buring, JE, Stampfer, MJ, Michael Gaziano, J (2006). Dyslipidemia and the Risk of Incident Hypertension in Men. *Hypertension* 47: 45-50.
- Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC (1993): The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 21: 455-60.
- Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogihara T (1993): Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 399-404.
- Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA (1998): Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 32: 387-92.
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F (1991) Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 266 (23): 15377-83.
- Jelakovi B, Leganovi M, Serti J, Ron evi T, Borso G, Vidovi M, Željкови T, Cvoriscec D, Stavljeni -Rukavina A (2002): ApoE gene, not ACE gene, polymorphism determines blood pressure pattern in essential hypertension. *J Hypertens* 20 Suppl 4: 137.
- Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM (1992): Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1: 72-5.
- Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo A-P, Hata A, Corvol P, Lalouel J-M (1997): Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 51: 1448–1460.
- John U, Meyer U, Hanke M, Völzke H, Schumann A (2006) Smoking status, obesity and hypertension in a general population sample: a cross-sectional study. *QJM* 99(6):407-415.
- Jones HB (1998) The relative power of linkage and association studies for the detection of genes involved in hypertension. *Kidney Int* 53 (6): 1446-8.



- Jeffery S, Malik AKS, Crosby A, Bland M, Eastwood JB, Amoah-Danquah J, Acheampong JW, Plange-Rhule J (1999) A dominant relationship between the ACE D allele and serum ACE levels in a Ghanaian population. (Letter) *J Med Genet* 36: 869-870.
- Jobling MA, Hurles M, Tyler-Smith C (2004): Human evolutionary genetics. Origins, Peoples and Disease. Garland Publishing, New York.
- Kanashiro CA, Khalil RA. Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280:C34–C45.
- Kiema TR, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA, Savolainen MJ (1996): Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen loci in relation to blood pressure. *Hypertension* 28: 1070–1075.
- Kruglyak L (1999) Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22: 139–144.
- Lackland DT, Keil JE (1996) Epidemiology in African Americans. *Semin Nephrol* 16 (2): 63-70.
- Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-48.
- Levy SB, Lilley JJ, Frigon RP, Stone RA (1977): Urinary kallikrein and plasma rennin activity as determinants of renal blood flow. The influence of race and dietary sodium intake. *J Clin Invest* 60: 129-38.
- Lund – Johansen P (2002) Hemodynamic effects of calcium antagonists in hypertension. U: Epstein M (ed.) Calcium antagonists in clinical medicine. Hanley & Belfus, inc., Philadelphia, 315-335.
- Luo ZW, Tao SH, Zeng Z-B (2000) Inferring linkage disequilibrium between a polymorphic marker locus and a trait locus in natural populations. *Genetics* 156: 457-467.
- Martinovi I, Mastana s, Jani ijevi B, Jovanovi V, Paphia SS, Roberts DF, Rudan P (1998) VNTR DNA variation in the population of the island of Hvar, Croatia. *Ann Hum Biol* 25: 489-99.
- Minami J, Ishimitsu T, Matsuoka H (1999) Effects of smoking cessation on blood pressure and heart rate variability in habitual smokers. *Hypertension* 33:586–90.
- Morise T, Takeuchi Y, Takeda R (1994): Angiotensin-converting enzyme polymorphism and essential hypertension. *Lancet* 343: 125.
- Mufunda J, Mebrahtu G, Usman A, Nyarango P, Kosia A, Ghebrat Y, Ogbamariam A, Masjuan M, Gebremichael A (2006) The prevalence of hypertension and its relationship with obesity: results from a national blood pressure survey in Eritrea. *Journal of Human Hypertension* 20: 59–65.
- Mufunda J (2007) Body mass index and blood pressure: where are we now? *Journal of Human Hypertension*.21: 5–7.

- Muller DN, Bohlander J, Hilgers KF, Dragun D, Costerousse O, Menard J, Luft FC (1997) Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II. *Hypertension*. 29:98-104
- Muller DN, Luft FC (1998): The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 2: 7-14.
- Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K (1994) Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 90: 2199-2202.
- Nickenig G. Central role of the AT(1)-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens*. 2002; 16 Suppl 3: S26–S33.
- Nickenig G, Harrison DG (2002) The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation* 105: 530–536.
- Nohria A, Garrett L, Johnson W, Kinlay S, Ganz P, Creager MA (2003) Endothelin-1 and vascular tone in subjects with atherogenic risk factors. *Hypertension*. 42: 43–48.
- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D (1998): Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97: 1766-1772.
- Omvik P (1996) How smoking affects blood pressure. *Blood Press* 5:71–7.
- Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA (2003) Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med*. 139: 761–776.
- Orshal JM, Khalil RA (2004) Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286:R233–R249.
- Page GP, Amos CI (1999) Comparison of linkage-disequilibrium methods for localization of genes influencing quantitative traits in humans. *Am J Hum Genet* 64: 1194–1205.
- Perkins KA (1993) Weight gain following smoking cessation. *J Consult Clin Psychol* 61:768–77.
- Perić M (2005) Review of Croatian genetic heritage as revealed by mitochondrial DNA and Y chromosomal lineages. *Croat Med J* 46: 502-13.
- Rasmussen F, Tynelius P, Kark M (2003) Importance of smoking habits for longitudinal and age-matched changes in body mass index: a cohort study of Swedish men and women. *Prev Medicine* 37:1–9.
- Reaven GM, Lithell H, Landsberg L (1996) Hypertension and associated metabolic abnormalities: the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med*. 334: 374–381.

Ribeiro MB, Ribeiro AB, Neto CS, Chaves CC, Kater CE, Iunes M, Saragoca MA, Zanella MT, Ancao MS, Marson O, Kohlmann O Jr, Franco RJ, Nules SF, Ramos OL (1981) Hypertension and economic activities in Sao Paulo, Brazil. *Hypertenzion* 3: II-233-7.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346.

Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier, F (1992) PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidylcarboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 20: 1433.

Rudan I, Campbell H, Rudan P (1999) Genetic epidemiological studies of eastern Adriatic Island isolates, Croatia: objective and strategies. *Coll Antropol* 23(2):531-46.

Rudan I, Rudan D, Campbell H, Carothers A, Wright A, Smolej Naran i N, Jani ijevi B, Jin L, Chakraborty R, Deka R, Rudan P (2003a) Inbreeding and risk of late-onset complex disease. *J Med Genet* 40: 925-32.

Rudan I, Smolej Naran i N, Campbell H, Carothers A, Wright A, Jani ijevi B, Rudan P (2003b): Inbreeding and the genetic complexity of human hypertension. *Genetics* 163: 1011-21.

Rudan P, Šimi D, Smolej Naran i N, Bennett LA, Jani ijevi V, Lethbridge MF, Mili i J, Roberts DF, Sujoldži A (1987) Isolation by distance in Middle Dalmatia-yugoslavia. *Am J Phys Anthropol* 74: 417-26.

Rudan P, Sujoldži A, Šimi D, Bennett LA, Roberts DF (1992) Population structure in the eastern Adriatic: the influence of historical processes, migration patterns, isolation and ekologikal pressures, and their interactin. U: Isolation, Migration and Health. D. F. Roberts, N. Fujiki, K. Torizuka (eds.), SSHB 33, *Cambridge Univ. Press*, SSHB 33: 204-18.

Rudan P, Jani ijevi V, Jovanovi V, Mili i J, Smolej Naran i N, Sujoldži A, Szivoczka L, Škari -Juri T, Bara Lauc L, Lauc T, Martinovi -Klari I, Peri i M, Rudan D, Rudan I (2004) Holistic anthropologikal research of Hvar islanders, Croatia: From parish registries to DNA studies in 33 years. *Coll Antropol* 28 (Supl.): 319-41.

Schmidt S, van Hooft IM, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E (1993): Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens* 11: 345-8.

Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kurzinger S, Riegger GA (1997) Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 95 (1): 39-45.

Smolej Naran i N, Rudan I (2001) Endogamy and variation in blood pressure levels in Croatian island isolates. *J Physiol Anthropology* 20:85-94.

Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P (1988) Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Nat Acad Sci* 85: 9386-9390.

Stumpf MP, Goldstein DB (2003) Demography, recombination hotspot intensity, and the block structure of linkage disequilibrium. *Curr Biol* 13: 1-8.

Subcommittee W-IG (1999) 1999 World Health Organization – International society of hypertension guidelines for the management of hypertension. *Journal of Hypertension* 17: 151-183.

Škarić-Jurić T, Ginsburg E, Kobylansky E, Malkin I, Smolej Narančić N, Perić M, Rudan P (2003) Complex segregation analysis of blood pressure in three Middle Dalmatian islands, Croatia. *Am J Hum Genet* 73:371- 371.

Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N (2003) Prevalence of hypertension and family aggregation of blood pressure in Middle Dalmatia, Croatia. Proceedings: 12th Annual Meeting of the International Genetic Epidemiology Society / Siegmund, Kim (eds.) Los Angeles, USA: *International Genetic Epidemiology Society*, 52-52.

Škarić-Jurić T, Ginsburg E, Kobylansky E, Malkin I, Barbalić M, Perić M, Milić J, Smolej Narančić N, Rudan P (2005) Segregation analysis of systolic and diastolic blood pressure in Middle Dalmatia Island population. *Coll Antropol* 29:301- 307.

Tahri – Daizadeh N (2003) Exploration systematique d'effets multi-loci intra- et inter-genes dans les etudes d'association genetique. Doktorska disertacija. Faculte de medicine Paris-Sud, Universite Paris XI, Paris.

Terwilliger JD, Goring HH (2000) Gene mapping in the 20<sup>th</sup> and 21st centuries: Statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol* 72: 63–132.

Terwilliger JD, Weiss KM (1998) Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr Opin Biotechnol* 9: 578–594.

Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F (1992) Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51(1): 197–205.

Tiret L, Blanc H; Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F (1998) Gene polymorphisms of renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke; the PEGASE study. Project d'Etude des Genes de L'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. *J Hypertension* 16 (1): 37-44.

Tolk HV, Perić M, Barać L, Klarić IM, Janićević B, Rudan I, Parik J, Villems R, Rudan P (2000) MtDNA haplogroups in the populations of Croatian Adriatic Islands. *Coll Antropol* 24: 267-80.

Varilo T, Paunio T, Parker A, Perola M, Meyer J, Terwilliger JD, Peltonen L (2003) The interval of linkage disequilibrium (LD) detected with microsatellite and SNP marker in chromosomes of Finnish populations with different histories. *Hum Mol Genet* 12: 51-9.

Vassilikioti S, Doulas M, Douma S, Petidis K, Karagiannis A, Balaska K, Vyzantiadis A, Zamboulis C (1996): Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a Greek population. *Am J Hypertens* 9: 700-2.

Vikrant S, Tiwari SC (2001) Essential hypertension – pathogenesis and pathophysiology. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine* 2 (3): 140-161.

Wang D, Lander E (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077–1082.

Wright AF, Carothers AD, Pirastu M (1999) Population choice in mapping genes for complex diseases. *Nat Genet* 23: 397-404.